Untersuchungen über die toxische Wirkung des Herbizides Aretit® (Dinoseb-Acetat) auf Nicht-Ziel-Organismen im Süßwasser-Ökosystem

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Thomas Bertram Keller

aus Ochsenhausen

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536517_0031

Untersuchungen über die toxische Wirkung des Herbizides Aretit® (Dinoseb-Acetat) auf Nicht-Ziel-Organismen im Süßwasser-Ökosystem

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Thomas Bertram Keller

aus Ochsenhausen

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 1984

Dekan: Prof. Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Kulzer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.- U. Schnitzler

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Meinen Eltern

und

Karin

Ich möchte an dieser Stelle allen Institutionen und Personen danken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
Mein besonderer Dank gilt

Prof. Dr. E. Kulzer für die Überlassung des Themas, für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, seine geduldige und vielfältige Hilfe bei wissenschaftlichen und methodischen Problemen und für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

dem Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Umwelt und Forsten Baden Württemberg für die Förderung dieser Untersuchungen im Rahmen des Projektes: Auswirkungen von Pflanzenbehandlungsmitteln auf Süßwasserökosysteme, Projektleiter Prof. Kulzer.

Prof. Dr. C.F. Bardele für die Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate und Fotografien.

Dr. E. Müller für zahlreiche methodische Hilfen, Anregungen und den kritischen und fruchtbaren Gedankenaustausch.

Dr. R. Lorenz (BFA f. Viruskrankheiten) für die Beratung zur statistischen Bearbeitung der Untersuchungsergebnisse.

Dr. W. Rähle für die Nachbestimmung der in den Screening-Versuchen verwendeten Tierarten.

Dr. F. Dittmann für die Mitbenutzung von Geräten.

allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Zoophysiologie, insbesondere Dr. D. Kling, F. Kimmich und A. Waldschmidt für viele große und kleine Hilfeleistungen bei der Versuchsplanung wie auch -durchführung.

dem Regierungspräsidium Tübingen, höhere Naturschutzbehörde, für die Erteilung der Genehmigung zur Entnahme von Froschlaich.

Teil I

Screening-Versuche, Auswirkungen auf interspezifische Beziehungen und Fluchtreaktionen

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Summary 1

II. Einleitung 3

III. Screening-Versuche 5

Material und Methoden 5

Ergebnisse 7

1. Mollusca 7

Planorbarius corneus 7

Radix peregra f. peregra 8

2. Annelida 10

Tubifex tubifex 10

3. Arthropoda 12

Gammarus fossarum 12

Halesus auricollis 16

4. Vertebrata 18

a) Pisces 18

Salmo gairdneri 18

Salmo trutta 21

Thymallus thymallus 22

Cyprinus carpio 24

b) Amphibia 26

Rana temporaria (Larven) 26

IV. Auswirkungen der Intoxikation auf einfache interspezifische Beziehungen innerhalb einer Nahrungskette 28

Material und Methoden 28

1. Versuche in Aquarien ohne Grundbedeckung 28

Seite

2. Versuche in Aquarien mit Grundbedeckung 29

3. Versuche über die Räuber-Beute-Beziehungen in einem simulierten Habitat .....

Ergebnisse 30

1. Versuche in Aquarien ohne Grundbedeckung 30

2. Versuche in Aquarien mit Grundbedeckung 37

3. Versuche über die Räuber-Beute-Beziehungen in einem simulierten Habitat 44

V. Fluchtreaktionen von Amphibienlarven und Fischen bei verschiedenen Aretit®-Konzentrationen 45

Material und Methoden 45

Ergebnisse 47

1. Versuche mit Larven von Rana temporaria 47

2. Versuche mit Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) 48

3. Versuche mit Tilapien (Sarotherodon leucostictus) 51

VI. Diskussion 53

VII. Zusammenfassung 67

VIII. Literatur 69

I. Summary

The tolerances of different nontarget organisms to Aretit® were screened and the effects on simple aquatic population interactions examined. Moreover it was examined, whether tadpoles and fishes are capable to detect the substance Aretit® in the water and respond to the chemical stress with a direct avoidance reaction.

1. Static bioassays were conducted to determine the acute toxicity of the dinitrophenolderivate to different invertebrates (Planorbarius corneus, Radix peregra, Tubifex tubifex, Gammarus fossarum, Halesus auricollis) and vertebrates (Salmo trutta, Salmo gairdneri, Thymallus thymallus, Cyprinus carpio, Rana temporaria larvae) of the aquatic ecosystem. There were 96 h static water tests used (except for Gammarus, which experienced 48 h test). The 96 h LC_{50}-values were calculated by a computerized probit analysis program, the toxic effects to the organisms were monitored by visual observation. The highest susceptibility to Aretit® was exhibited by Gammarus fossarum (48 h LC_{50} 0,05 ppm); Tubifex tubifex was the most tolerant of the species tested (96 h LC_{50} 1,34 ppm). Within the 4 species of fishes the 96 h LC_{50} ranged from 0,06 ppm for Salmo trutta to 0,11 ppm for Salmo gairdneri.

2. In experiments the effects of treatment with Aretit® on simple aquatic predator-prey interactions were examined. A fish-macroinvertebrate predation system with Salmo gairdneri as predator and Gammarus fossarum as prey was used. The time, required for the capture of 5 and 10 crayfishes, was recorded as a direct parameter. Another part of the experiments was to measure total food consumption within a time period of 15 minutes.

The results showed, that after an intoxication of the fishes the prey consumption decreased and the time needed for the capture of the crayfishes was prolonged. It was found, that the intoxication of the fish reached its maximum effect at 12 h. After 24 h the response was almost regenerated, after 36 h normal behaviour was observed. Intoxication of the prey produced different results, depending on the condition of the organisms after the treatment with Aretit® . A short stay in the toxic solution caused a hyperactivity of the prey and therefore presumably made it more conspicous for the fish. More crayfishes were captured in the time. Extended treatment (24 h) reduced the predation rate extremely, because now the prey was less active than controll organisms. Thus the greatest measurable effects in predator-prey interactions were observed after behavioral alterations of the prey. The assays in the simulated ecosystem showed, that Salmonides are capable of discerning behavioral abnormalities in their prey, which is not obvious to a human observer. Already a treatment of the crayfishes with 0,00001 ppm showed measurable effects on the predation rates. These simple predator-prey interactions are an extremely sensitive toll for detecting chemical hazard assesment.

3. Lethal and sublethal Aretit®-concentrations produced no avoidance reaction by the tadpole stage of Rana temporaria. The freshwater fishes Salmo gairdneri and Sarotherodon leucostictus did not avoid sublethal concentrations, but did avoid lethal concentrations. A visible physical irritation was observed prior to any avoidance reaction. The registered behavioral response is probably indirectly caused by a damage of the fish and not via the perception of sensory organs.

II. Einleitung

Die Auswirkungen der Pestizide auf die "Nicht-Zielorganismen" unserer natürlichen Binnengewässer sind äußerst komplex und meist nicht vorhersagbar. Sie reichen von totaler Vernichtung über kurzfristige Schädigung bis zur indirekten Einwirkung (Entzug der Nahrungsorganismen, Beeinträchtigung der Fortpflanzung). Zur Beurteilung dieser Verhältnisse wurden zahlreiche Laborversuche entwickelt (Zusammenfassung bei Besch 1977), die jedoch in ihrer Aussagekraft alle beschränkt sind. Sie erfassen nur kleinste räumliche und zeitliche Ausschnitte eines natürlichen Ökosystems. Trotzdem sind sie notwendig. Sie ermöglichen einerseits ein rasches Erkennen von Vergiftungsfällen, andererseits liefern sie gesicherte und reproduzierbare Ergebnisse, die zur Diagnose von Gewässerkontaminationen unerläßlich sind.

Der Einsatz von Herbiziden ist innerhalb der letzten 20 Jahre dramatisch angestiegen. Während 1966 in den Vereinigten Staaten rund 113.000 t Herbizide angewendet wurden, waren es 1981 bereits 312.000 t - mehr als die gesamte Aufwandmenge an Insektiziden (Hileman 1982). Direkt oder indirekt geraten diese Substanzen in Flüsse und Seen und stellen hier in zunehmendem Maße eine Belastung dar. Sie bedrohen - je nach dem Grad ihrer Toxizität - die Organismen (Alabaster und Lloyd 1980, Brown 1978, Buikema et al. 1979, Hart und Fuller 1974, Hassall 1982, Johnson 1968, Menzie 1972, Muirhead-Thompson 1971, Pickering et al. 1983, Piementel 1971, Spehar et al. 1980).

Die zahlreichen Herbizide aus der Gruppe der Dinitrophenole sind für alle Organismen giftig. Sie wurden bereits im vergangenen Jahrhundert entwickelt und erstmals 1892 als Ovizide eingesetzt. Die rasch erkannte, vielseitige Toxizität führte bald zur Verwendung als Insektizid, Fungizid, Acarizid und schließlich als Herbizid (Cremlyn 1978). Mit der fortschreitenden Entwicklung spezifisch wirkender Gifte wurde die Anwendung der

Dinitrophenole auf den Bereich der Herbizide eingeschränkt. Ihre Giftwirkung entsteht dadurch, daß sie im Bereich der Zellatmung die oxidative Phosphorylierung blockieren. Dabei wird die ATP-Synthese in pflanzlichen - wahrscheinlich auch in tierischen Zellen - unterbrochen (Ashton und Crafts 1973).

Die bekannt große Toxizität der Dinitrophenole gegenüber den obligatorischen Testfischen verleiht der Frage nach den möglichen Auswirkungen im Bereich der Binnengewässer eine hohe Aktualität. Die vorliegende Untersuchung wurde aus diesem Grunde zunächst in drei Richtungen geführt:

1. Durch Screening-Versuche sollten die möglichen Auswirkungen (Empfindlichkeit, Vergiftungsbild, Wirkungsdauer) erfasst werden.

2. In einfachen Dressurversuchen mit Fischen sollten die Auswirkungen einer Vergiftung auf die zwischenartlichen Nahrungsbeziehungen (Teil der Nahrungskette) untersucht werden.

3. Die nach Kontamination eines Gewässers lebenswichtigen Ausweich- und Fluchtreaktionen sollten an Beispielen (Amphibienlarven und Fische) geprüft werden.

III. Screening-Versuche

Material und Methoden

Die akute Toxizität des Herbizides Aretit® mit dem Wirkstoff Dinoseb-Acetat (Wirkstoffmenge 492 g/l; chem. Bezeichnung: 2-(1-Methylpropyl)-4,6-dinitrophenol-acetat) wurde in einem statischen Testverfahren (Schulz 1981, Besch 1977) an folgenden Süßwasserorganismen untersucht:

Evertebrata

Mollusca:	*Planorbarius corneus* Linné
	Radix peregra f. peregra Müller
Annelida:	*Tubifex tubifex* Müller
Arthropoda:	*Gammarus fossarum* Koch
	Halesus auricollis Pictet

Vertebrata

Pisces:	*Salmo gairdneri* Richardson
	Salmo trutta Linné
	Thymallus thymallus Linné
	Cyprinus carpio Linné
Amphibia:	*Rana temporaria* (Larven) Linné

Nach einer mindestens 10-tägigen Eingewöhnungszeit wurden die Versuchstiere nach Größenklassen in unterschiedlicher Zahl in die Versuchsbekken, die über Pasteurpipetten belüftet wurden, eingesetzt. Die Adaptationszeit an die Versuchsbedingungen betrug 15 bis 24 Stunden. Der O_2-Gehalt des Wassers lag stets nahe der Sättigung. Um die Versuchstiere vor optischen Reizen zu schützen wurden die Aquarien auf allen Seiten durch Pappe abgeschirmt. Jeweils 1/4 Stunde vor Versuchsbeginn wurde eine 0,1 %ige bzw. 1,0 %ige Aretit®-Stammemulsion hergestellt und anschließend in entsprechenden Mengen in die Versuchsbecken einpipettiert. Die Versuchsdauer betrug 96 h (Ausnahme: Versuche mit Gammariden). Das Wasser wurde in dieser Zeit nicht ausgetauscht. Tote Tiere wurden sofort aus den Versuchsgefäßen entfernt. Die Versuche an Individuen einer Art wurden jeweils in mehreren Versuchsreihen durchgeführt. Am Ende des Versuchs (nach 96 h)

wurden die überlebenden Individuen in Vollglasbecken umgesetzt, die mit abgestandenem, gut durchlüftetem Tübinger Leitungswasser gefüllt waren; hier erfolgte eine 48-stündige Nachbeobachtung. Alle Versuche wurden bei 10 ^{o} C durchgeführt (LD = 12:12 h). Wasser, Temperatur, O_2-Gehalt, ph-Wert und Gesamthärte wurden jeweils bei Versuchsbeginn und -ende bestimmt. 48 h vor Versuchsbeginn wurde zum letzten Mal gefüttert.

Für orientierende Versuche wurde die "Organismen-Ebene" (Individuen jeweils einer Art) gewählt (Besch 1982). Der Vergiftungsverlauf wurde für jede untersuchte Art protokolliert. Zur Bewertung der toxischen Wirkung der Testsubstanz dienten folgende Parameter:

Grenzkonzentration: höchste Konzentration bei der noch keine Schädigungen zu erkennen sind.

Schwellenkonzentration: niedrigste Konzentration bei der erstmals Vergiftungssymptome auftreten.

letale Konzentration: Konzentration bei der alle Versuchsorganismen in einem bestimmten Zeitraum absterben.

mittlere letale Konzentration (LC_{50}): Konzentration bei der 50 % der Tiere in einem festgelegten Zeitraum absterben.

mittlere effektive Konzentration (EC_{50}): Konzentration bei der 50 % der Tiere eine bestimmte "Antwort" zeigen, z.B. Störungen der Schwimmfähigkeit, Lähmungen etc.

Zur Schätzung der mittleren tödlichen und der mittleren effektiven Konzentration wurde eine vollständige Probitanalyse durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten auf der Rechenanlage TR 440 des Zentrums für Datenverarbeitung der Universität Tübingen unter Verwendung des Programmpaketes GLIM (3. Version mit Ergänzungen), das von Herrn Dr. Deichsel am Institut für Medizinische Biometrie entwickelt wurde.

Verwendete Abkürzungen:

GC = Grenzkonzentration
GG = Gesamtgewicht
GL = Gesamtlänge
KL = Körperlänge
LC = Letale Konzentration
LD = Licht-Dunkel-Wechsel
SC = Schwellenkonzentration
TLW = Tübinger Leitungswasser
VB = Versuchsbeginn
VE = Versuchsende

Ergebnisse

1. Mollusca

Planorbarius corneus (Gastropoda)

Die adulten Tiere wurden vor Versuchsbeginn bei einer Temperatur von 10 ± 0,2 °C mindestens 10 Tage eingewöhnt. Als Nahrung diente Salat. Für die Versuche wurden Vollglasbecken (20x20x15 cm) mit 4 l TLW verwendet (24 h Eingewöhnungszeit; Wassertemperatur 10,0 ± 0,1 °C; O_2-Gehalt 9,0 ± 0,2 mg/l; ph-Wert 8,2 ± 0,2; Härte 9 °dH). Auf die Angabe der Todeszeiten mußte verzichtet werden, da diese nicht immer exakt festzustellen waren.

Grenzkonzentration[1]	GC:	0,2 ppm ≤ GC < 0,4 ppm
Schwellenkonzentration[2]	SC:	0,2 ppm < SC ≤ 0,4 ppm
letale Konzentration[3]	LC:	2,0 ppm < LC ≤ 3,0 ppm

Tab. 1: Planorbarius corneus, LC_{50}-Werte.

Versuchsdauer (h)	LC_{50} (ppm)	95 % Vertrauensgrenzen (ppm)	Gleichung der Probitgeraden y= Probit; x= lg (Dosis)
96	1,07	0,68 und 1,45	y= 4,91 + 3,35 x
96+48*	1,07	0,68 und 1,45	y= 4,91 + 3,35 x

* bedeutet stets Nachbeobachtungszeit im Frischwasser

Vergiftungsbild: Bei Versuchsbeginn kriechen alle Schnecken mit ausgestreckten Fühlern am Boden oder an den Seitenwänden der Aquarien. Nach 15 Minuten Einwirkungszeit (Konzentration 10 bis 15 ppm) ziehen die Tiere ihre Fühler ein oder sie ziehen sich in ihr Gehäuse zurück. Eine besondere Erregungsphase gibt es nicht. Anschließend sinken die Schnecken unter Luftabgabe auf den Aquariengrund oder treiben frei an der Wasseroberfläche. Sie bilden Schleim-

1 2 3 sie werden stets als Bereich angegeben, da sie nicht als konkretes Ergebnis vorliegen und nicht berechnet werden können.

pröpfe; nur bei 15 ppm wird Blut ausgestoßen. Bei Konzentrationen < 2 ppm ist die Zeit zur Retraktion der Fühler nach Berührungsreizen verzögert. Verschiedentlich ziehen sich die Individuen erst nach 20 bis 40 Stunden in das Gehäuse zurück. Der Fuß bleibt jedoch - im Gegensatz zu den abgestorbenen Tieren - noch immer frei. Lebende Schnecken zeigen zudem eine Reaktion auf Berührung der Sohle mit einer Nadel. Bei Konzentrationen von 0,2 bis 5 ppm geben die Schnecken auffallend große Kotmengen ab. Die in den Versuchen nicht abgestorbenen Schnecken erholen sich nach 48 h Frischwasserphase wieder weitgehend, nach 96 h (Frischwasser) sogar vollkommen und nehmen erneut Nahrung auf.

Tab. 2: Planorbarius corneus, Mortalitätsraten und Eintrittszeiten.

Aretit® Konzentration (ppm)	Zahl der Versuchstiere	Mortalität nach 48 h (%)	Mortalität nach 96 h (%)	Eintrittszeit (h)
0,05	5	-	-	-
0,1	4	-	-	-
0,2	5	-	-	-
0,4	5	20	20	4
0,6	5	20	20	4
0,8	5	20	20	1,5
1,0	5	40	40	1,5
2,0	5	80	80	1,5
3,0	4	100	100	0,5
5,0	4	100	100	0,5
10,0	5	100	100	0,25
15,0	5	100	100	0,25

Radix peregra f. peregra (Gastropoda)

Haltungs- und Versuchsbedingungen entsprachen denen der Planorbarien. Es wurden 3 Versuchsreihen in TLW durchgeführt (Wassertemperatur 10,0 $\pm$ 0,2 °C; O_2-Gehalt 8,9 $\pm$ 0,3 mg/l; ph-Wert 8,3 $\pm$ 0,2; Härte 9 ° dH).

Grenzkonzentration	GC:	0,3 ppm ≦ GC < 0,4 ppm
Schwellenkonzentration	SC:	0,3 ppm < SC ≦ 0,4 ppm
letale Konzentration	LC:	1,1 ppm < LC ≦ 1,2 ppm

Tab. 3: Radix peregra, LC_{50}-Werte.

Versuchs-dauer (h)	LC_{50} (ppm)	95 % Vertrauens-grenzen (ppm)	Gleichung der Probitgeraden y= Probit; x= lg (Dosis)
48	0,91	0,83 und 0,99	y= 5,37 + 8,68 x
96	0,80	0,74 und 0,87	y= 6,00 +10,51 x
96+48	0,79	0,73 und 0,85	y= 6,00 + 9,68 x

Vergiftungsbild: Normalerweise bewegen sich die Schnecken auf einem Schleimband an den Glaswänden des Beckens oder an der Wasseroberfläche. 15 bis 30 Minuten nach der Giftzugabe (Konzentrationen > 1,3 ppm) treten die ersten Verhaltensstörungen auf: Die Schnecken stoßen Luft aus ihrer Atemhöhle aus und sinken zu Boden. Nach einer weiteren Stunde haben sich alle in ihre Gehäuse zurückgezogen. Bei Konzentrationen > 1,3 ppm bleiben die Tiere am Grund des Beckens liegen oder lassen sich an der Wasseroberfläche treiben. Der Fuß sezerniert dabei große Schleimmengen, die schließlich das ganze Haus einschließen. Die Schädigung der Tiere ist dann bereits irreversibel. Meist tritt nach wenigen Stunden der Tod ein. Bei Konzentrationen < 1,3 ppm strecken die Schnecken häufig Kopf und Fuß aus dem Gehäuse heraus. In diesem regungslosen Zustand überleben sie oder sterben ohne weitere Verhaltensänderung ab. In einigen Fällen verlassen die Schnecken ihr Gehäuse auch ganz (Abriß des Schalenmuskels). Diese Tiere sinken auf den Beckengrund und sind nach etwa 2 h tot. Die Verhaltensstörungen lassen sich nicht mit der jeweiligen Giftkonzentration korrelieren.

Tab. 4: Radix peregra, Mortalitätsraten, Eintrittszeiten und Todeszeiten.

Aretit® Konzentration (ppm)	Mortalität nach 48 h (%)	96 h (%)	96+48 h (%)	Eintrittszeit (h)	Todeszeit (h)
0,3	-	-	-	-	-
0,4	-	-	-	4	-
0,5	-	-	-	4	-
0,6	-	-	10	2,5	110
0,7	30	50	50	2,5	48 - 70
0,8	40	50	50	2	48 - 70
0,9	40	70	70	1,5	48 - 70
1,0	60	70	70	1	48 - 70
1,1	80	90	90	1	48 - 70
1,2	80	100	100	1	48 - 70
1,3	90	100	100	1	48 - 70
1,5	100	100	100	0,5	6 - 20
2,0	100	100	100	0,5	6 - 20
5,0	100	100	100	0,5	6 - 20
10,0	100	100	100	0,25	2 - 20

2. Annelida

Tubifex tubifex (Clitellata)

Die Würmer wurden in fließendem und gut belüftetem Leitungswasser in Plastikschalen (40x20x7 cm) gehalten (Temperatur 10,0 $\pm$ 0,2 °C; LD 12:12 h). Als Versuchsgefäße dienten Rundglasschalen mit je 500 ml TLW. Auf eine Bodenbedeckung wurde verzichtet. Pro Gefäß und Konzentration wurden 50 Würmer verwendet (Anpassungszeit 24 h). Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt (Wassertemperatur 10,0 $\pm$ 0,2 °C; O_2-Gehalt 9,0 $\pm$ 0,4 mg/l; ph-Wert 7,5 $\pm$ 0,2; Härte 8 ° dH).

Grenzkonzentration	GC:	0,25 ppm $\leq$ GC < 0,5 ppm
Schwellenkonzentration	SC:	0,25 ppm < SC $\leq$ 0,5 ppm
letale Konzentration	LC:	3,0 ppm < LC $\leq$ 4,0 ppm

Tab. 5: Tubifex tubifex, LC_{50}-Werte.

Versuchs-dauer (h)	LC_{50} (ppm)	95 % Vertrauens-grenzen (ppm)	Gleichung der Probitgeraden y= Probit; x= lg (Dosis)
96	1,85	1,68 und 2,02	y= 4,15 + 3,17 x
96+48	1,34	1,20 und 1,49	y= 4,63 + 2,89 x

Vergiftungsbild: In den Versuchsbecken bilden die Würmer sofort dichte Knäuel. Auf die Zugabe von Aretit® (< 1 ppm) reagieren sie mit heftigen Schlängelbewegungen (Erregungsphase). Bei höheren Konzentrationen (> 2,5 ppm) lösen sich die Knäuel nach etwa 20 Minuten Einwirkungszeit wieder auf. Einzelne Tiere ziehen sich krampfhaft zusammen und zeigen danach eine vollständige Lähmung. Erst nach einigen Minuten strecken sie sich erneut aus. Die Eintrittszeit dieser Reaktion (bis zur Lähmung) steht in Beziehung zur Giftkonzentration. Während der Vergiftung sezernieren die Würmer erhebliche Schleimmengen, die ihren Körper nach und nach vollständig einhüllen. Häufig sterben die Tiere vom Körperende her ab (vollständige Entfärbung). Eine Wiedererholung in der Frischwasserphase ist in diesem Stadium nicht mehr möglich.

Tab. 6: Tubifex tubifex, Mortalitätsraten, Eintrittszeiten und Todeszeiten.

Aretit® Konzentration (ppm)	Mortalität nach 96 h (%)	96+48 h (%)	Eintrittszeit (h)	Todeszeit (h)
0,5	8	16	1	48 - 110
1,0	16	36	0,5	48 - 110
1,5	30	40	0,5	48 - 110
2,0	36	48	0,5	30 - 120
2,25	50	80	0,5	30 - 120
2,5	72	90	0,25	30 - 110
3,0	80	96	0,25	15 - 110
4,0	100	100	0,25	14 - 60
7,0	100	100	0,16	10 - 40

3. Arthropoda

Gammarus fossarum (Crustacea)

Die Krebschen wurden in 10 l Vollglasbecken (Wassertemperatur 10,0 ± 0,2 °C) auf Quarzsand und Steinen gehalten; als Nahrung erhielten sie Schwarzerlenblätter. Nach einer zweiwöchigen Eingewöhnung wurden sie in die Versuchsbecken eingesetzt. Hierzu dienten 5 l Vollglasbecken (20x 20x15 cm) mit Netzkäfigen aus rostfreiem Edelstahl (Maschenweite 0,5 mm, 10x10x10 cm). Die Gitterkäfige dienten den Gammariden während des ganzen Versuchs zum Aufenthalt. Der Bodengrund war mit 150 g Glasperlen aus Sodakalkglas bedeckt. Dieser großflächige, aber chemisch neutrale Untergrund war für langfristige Haltung notwendig. Zur Vermeidung von Kannibalismus und Hungertod wurde den Tieren ein Erlenblatt (Trockengewicht 2 g) in die Käfige gelegt (Besch 1977). Als Testwasser diente gut durchlüftetes TLW (Wassertemperatur 10,0 ± 0,3 °C; O_2-Gehalt 9,3 ± 0,7 mg/l: ph-Wert 7,5 ± 0,5; Härte 8 ° dH). Die Adaptationszeit betrug 24 h. Pro Konzentration wurden 10 Tiere verwendet (GL 8-12 mm). Die Toxizitätsprüfungen wurden zur Ermittlung des LC_{50} in 3, zur Ermittlung des EC_{50} in 2 Versuchsreihen durchgeführt. Zur Bestimmung der effektiven Konzentration wurde die vollkommene Lähmung der Tiere (keine Reaktion auch bei mechanischer Reizung) herangezogen. Die Adaptationszeit betrug 15 h. Da die Kontrollen bei 96-stündiger Versuchsdauer schon Erschöpfungssymptome zeigten, wurde die Versuchsdauer auf 48+24 h Nachbeobachtung verkürzt.

Grenzkonzentration	GC:	$0{,}00001 \text{ ppm} \leq GC < 0{,}000025 \text{ ppm}$
Schwellenkonzentration	SC:	$0{,}00001 \text{ ppm} < SC \leq 0{,}000025 \text{ ppm}$
letale Konzentration	LC:	$0{,}1 \text{ ppm} < LC \leq 0{,}15 \text{ ppm}$

Tab 7: Gammarus fossarum, LC_{50}- und EC_{50}-Werte.

Versuchsdauer (h)	LC_{50} (ppm)	95 % Vertrauensgrenzen (ppm)	Gleichung der Probitgeraden y= Probit; x= lg (Dosis)
48	0,12	0,09 und 0,16	y= 7,12 + 2,33 x
48+24	0,05	0,04 und 0,07	y= 8,04 + 2,37 x
	EC_{50}		
24	0,0002	0,0001 und 0,0003	y= 9,74 + 1,27 x
48	0,0002	0,0001 und 0,0003	y= 9,76 + 1,29 x
48+24	0,0001	0,0000 und 0,0002	y= 9,11 + 1,05 x

Vergiftungsbild: Unter normalen Bedingungen halten sich die Krebse in dem Quarzsand oder unter dem Erlenblatt auf. Ihre Schwimmbewegungen dauern nur wenige Sekunden; danach verhalten sie sich wieder ruhig. Die ersten Anzeichen einer Vergiftung erkennt man an zunehmender Erregung. Die Krebschen verlassen dazu häufig ihren Ruheplatz und schwimmen immer wieder durch das freie Wasser. Einzelne Tiere verlassen sogar das Wasser und klettern am Netz empor. Die Eintrittszeit der Vergiftung ist von der Konzentration abhängig (Tab. 9). Bei fortschreitender Vergiftung werden die Schwimmstrecken kürzer und die Verweildauer am Grund länger. Danach folgen Koordinationsstörungen: Die Tiere rotieren um ihre Körperhochachse und fallen dann erschöpft zur Seite oder auf den Rücken; ihre Bewegungen sind krampfhaft, und häufig läßt sich beobachten, wie sie sich unter den Glasperlen vergraben, zusammenrollen oder s-förmig krümmen. Auf Berühren mit dem Glasstab reagieren sie mit Drehbewegungen oder kurzem Aufschießen. Vollständige Immobilisierung kennzeichnet die letzte Phase der Vergiftung. Als Kriterium des Lebens dient zu diesem Zeitpunkt nur noch der stark verlangsamte Pleopodenschlag. Wie auch bei Schwermetallvergiftungen (Schweiger 1956) tritt der Tod ohne besondere Merkmale ein. Postmortal ist sehr bald ein weitgehender Verlust der Pigmentierung zu erkennen.

Tab. 8: Gammarus fossarum, Lähmungsrate und Eintrittszeit der Lähmungen.

Aretit® Konzentration (ppm)	Lähmungsrate in % nach 24 h (%)	48 h (%)	48+24 h (%)	Eintrittszeit (h)
0,00001	–	–	–	–
0,000025	10	10	40	18 - 40
0,00005	20	30	30	14 - 24
0,000075	60	60	60	12 - 20
0,0005	70	70	70	12 - 20
0,001	60	60	60	8 - 11
0,005	100	100	100	6 - 7
0,0075	100	100	100	6 - 7
0,01	100	100	100	6 - 6,5

Tab. 9: Gammarus fossarum, Mortalitätsraten, Eintrittszeiten und Todeszeiten.

Aretit® Konzentration (ppm)	Mortalitätsrate nach 24 h (%)	48 h (%)	48+24 h (%)	Eintrittszeit (h)	Todeszeit (h)
0,05	–	–	–	6	–
0,0075	–	–	–	6	–
0,01	–	20	20	6	40 – 70
0,02	–	–	20	5	60 – 70
0,04	–	10	20	5	40 – 70
0,06	–	–	–	4	–
0,08	10	10	50	4	20 – 70
0,1	20	30	90	4	19 – 70
0,15	30	50	100	2	19 – 72
0,2	10	50	100	2	20 – 70
0,25	100	100	100	1,25	6 – 20
0,3	100	100	100	1,5	5 – 20
0,35	100	100	100	1,5	5 – 12

Regeneration: Um die Fähigkeiten zur Wiedererholung zu prüfen, wurde die Frischwasserphase auf 7 Tage ausgedehnt. Die Testkonzentrationen betrugen: 0,007, 0,005, 0,00005 und 0,000025 ppm. Unter diesen Bedingungen starben keine Individuen während der Behandlung ab. In der anschließenden Frischwasserphase kam es aber auch zu keiner vollständigen Wiedererholung. Die mit 0,005 und 0,007 ppm behandelten Tiere zeigten Lähmungen und starben während der Frischwasserphase (Tab. 10).

Tab. 10: Regenerationsfähigkeit bei Gammarus fossarum nach 48 h Vergiftung und unterschiedlich langer Frischwasserphase (g = gelähmt; t = tot; F = Frischwasserphase). 10 Versuchstiere pro Konzentration.

Aretit® Konzentration (ppm)	24 h F.	48 h F.	72 h F.	96 h F.	120 h F.
0,000025	4 g/ –	4 g/ –	4 g/ –	4 g/ –	4 g/ –
0,00005	3 g/ –	3 g/ –	3 g/ –	3 g/ –	3 g/ 1 t
0,005	10 g/ –	7 g/ 3 t	7 g/ 3 t	7 g/ 3 t	7 g/ 3 t
0,007	10 g/ –	6 g/ 4 t	6 g/ 4 t	6 g/ 4 t	4 g/ 6 t

Störungen des Fortpflanzungsverhaltens: Gammariden müssen zur erfolgreichen Fortpflanzung eine typische Präkopulationsstellung einnehmen (Kinne 1954). Dazu umgreift das ♂ das ♀ bereits vor der Eiablage. Eine vorzeitige Trennung der Partner verhindert die Fortpflanzung. Um zu prüfen, ob durch die Aretit®-Vergiftung eine vorzeitige Trennung erfolgt, wurden Intoxikationen bei folgenden Konzentrationen durchgeführt: 0,00001, 0,000025, 0,00005 und 0,000075 ppm. In der niedrigsten Konzentration trennten sich die Partner vor der Eiablage, schlossen sich aber teilweise erneut zusammen. Von 0,00005 ppm an lösten alle Tiere die Präkopulationsstellung; sie schlossen sich auch während der anschließenden Beobachtungszeit nicht mehr zusammen. Besondere Vergiftungserscheinungen waren bei diesen niedrigen Konzentrationen noch nicht zu erkennen (Tab. 11).

Tab. 11: Zahl der getrennten Paare von Gammarus fossarum nach 48 h Vergiftung und unterschiedlich langer Frischwasserphase (V = Vergiftung; F = Frischwasserphase). 10 Versuchspaare pro Konzentration.

Aretit® Konzentration (ppm)	24 h V.	48 h V.	48 h V.+ 24 h F.	48 h V.+ 48 h F.	48 h V.+ 120 h F.
0,00001	1	1	1	0	0
0,000025	3	6	6	6	4
0,00005	10	10	10	10	10
0,000075	10	10	10	10	10

Halesus auricollis (Insecta)

Die Haltung der Trichopterenlarven erfolgte in 10 l Aquarien (Wassertemperatur 10,0 ± 0,5 °C). Als Nahrung dienten Tubifex-Würmer. Nach 14-tägiger Eingewöhnungszeit wurden die Tiere in dieselbe Versuchsanlage eingesetzt, die für die Gammarus-Krebse Verwendung fand. Die Eingewöhnungszeit betrug 24 h. Pro Gitterkäfig und Konzentration wurden 10 Tiere in 2 Versuchsreihen getestet.

Grenzkonzentration	GC:	0,01 ppm ≤ GC < 0,1 ppm
Schwellenkonzentration	SC:	0,01 ppm < SC ≤ 0,1 ppm
letale Konzentration	LC:	0,3 ppm < LC ≤ 0,4 ppm

Tab. 12: Halesus auricollis, LC_{50}-Werte.

Versuchsdauer (h)	LC_{50} (ppm)	95 % Vertrauensgrenzen (ppm)	Gleichung der Probitgeraden y= Probit; x= lg (Dosis)
48	0,35	0,29 und 0,36	y= 8,55 + 7,28 x
96	0,30	0,26 und 0,33	y= 8,07 + 5,79 x
96+48	0,25	0,22 und 0,28	y= 9,3o + 7,21 x

Vergiftungsbild: Zwei bis drei Stunden nach dem Einsetzen in die Gitterkäfige haben die Larven in der Regel einen Standort gefunden. Sie strecken dann entweder Kopf und Beine aus dem Köcher heraus oder ziehen sich soweit zurück, daß der Kopf mit der Öffnung des Köchers abschließt. Als erste Reaktion auf den Giftstoff zeigen sie nach einer (von der Konzentration abhängigen) Latenzphase starke Erregung. Sie klettern dabei sogar über die Wasseroberfläche hinaus. Mit zunehmender Intoxikation werden die Bewegungen unkoordiniert. Die Tiere fallen dann immer wieder von den Seitenwänden auf den Boden und bleiben hier bis zu 10 Minuten liegen; sie bewegen dabei ihre Beine sehr heftig. In vielen Fällen ziehen sich die Larven ganz in ihren Köcher zurück. Sie reagieren nur noch auf

mehrmaliges Berühren des Körpers mit dem Glasstab. Weitgehend regungslos liegen sie tagelang am Boden oder hängen unbeweglich an den Metallgittern. Nur wenige Tiere verlassen den Köcher. Sie reagieren auf mehrfache Berührungsreize mit Krümmungsbewegungen. Für die Überlebenszeit (96 h Versuch mit 48 h Nachbeobachtung) spielt es keine Rolle, ob die Tiere innerhalb oder außerhalb des Köchers sind. Eine Wiedererholung in der Frischwasserphase war nur bis zu einer Konzentration von 0,175 ppm möglich. Bei höheren Konzentrationen zeigten die Tiere noch nach 10 Tagen Vergiftungssymptome. Sie reagierten auf Berührungsreize noch immer mit verlangsamten Bewegungen.

Tab. 13: Halesus auricollis, Mortalitätsraten, Eintrittszeiten und Todeszeiten.

Aretit® Konzentration (ppm)	Mortalitätsrate nach 48 h (%)	96 h (%)	96+48 h (%)	Eintrittszeit (h)	Todeszeit (h)
0,01	-	-	-	-	-
0,1	-	-	-	2,5	-
0,15	-	10	10	2,5	72
0,175	-	-	20	2	50 - 72
0,2	10	20	20	2	50 - 72
0,25	20	40	40	0,5	20 - 100
0,3	50	50	50	0,5	20 - 100
0,4	60	70	100	0,5	12 - 120
0,45	80	80	100	0,25	7 - 120
0,5	100	100	100	0,25	4 - 20
1,0	100	100	100	0,25	4 - 20

4. Vertebrata

a) Pisces

Salmo gairdneri (Salmonidae)

Die Fische wurden in 500 l Eternitbecken mit Durchfluß (Wassertemperatur 12 ± 1,5 °C) gehalten und täglich mit Forellenpellets (Raiffeisen) gefüttert. Nach einer Eingewöhnungszeit von 2 Wochen wurden die Toxizitätstests in Vollglasbecken (30x22x24,5 cm, 10 l TLW) durchgeführt (Wassertemperatur 10,0 ± 0,2 °C; O_2-Gehalt 8,9 ± 0,5 mg/l; ph-Wert 8,3 ± 0,1; Härte 9 ° dH). Die Adaptationszeit an die Versuchsbedingungen betrug 16 h. Pro Versuchsbecken wurden zwei Tiere verwendet (GL 13,4 ± 0,7 cm; KL 12,0 ± 0,6 cm; GG 25,6 ± 5,4 g).

Grenzkonzentration	GC:	0,05 ppm ≤ GC < 0,075 ppm
Schwellenkonzentration	SC:	0,05 ppm < SC ≤ 0,075 ppm
letale Konzentration	LC:	0,15 ppm < LC ≤ 0,2 ppm

Tab. 14: Salmo gairdneri, LC_{50}-Werte.

Versuchs-dauer (h)	LC_{50} (ppm)	95 % Vertrauens-grenzen (ppm)	Gleichung der Probitgeraden y= Probit; x= lg (Dosis)
3	0,14	0,12 und 0,16	y= 12,63 + 8,90 x
6	0,12	0,10 und 0,14	y= 14,12 + 9,92 x
12	0,11	0,10 und 0,13	y= 13,00 + 8,45 x
24	0,11	0,10 und 0,13	y= 13,00 + 8,45 x
48	0,11	0,10 und 0,13	y= 13,00 + 8,45 x
72	0,11	0,10 und 0,13	y= 13,00 + 8,45 x
96	0,11	0,10 und 0,13	y= 13,00 + 8,45 x
96+48	0,11	0,10 und 0,13	y= 13,00 + 8,45 x

Vergiftungsbild: Das erste Anzeichen einer Vergiftung ist die Erhöhung der Atemfrequenz *(1. Phase)*. Bei Konzentrationen > 0,3 ppm erfolgt die Steigerung bereits 10-15 Minuten nach Versuchsbeginn. Die Fische schwimmen dann unruhig im Becken umher *(2. Phase)* und schnappen wiederholt an der Wasseroberflä-

che nach Luft; danach erfolgt eine Steigerung der Atemtiefe, wobei der Mund während der Druckphase nicht mehr vollständig geschlossen wird.

Für den gesamten weiteren Vergiftungsverlauf ist das "Husten" und eine immer wiederkehrende Schüttelbewegung des Vorderkörpers typisch. Mit zunehmender Intoxikation treten während der Ruhephasen Störungen in der Körperlage auf. Die Fische kippen dann aus ihrer Normallage in eine Schräg-, Seiten- oder sogar Rückenlage *(3. Phase)*. In diesem Zustand reagieren sie auf Erschütterungsreize (Klopfen an die Beckenwand) nur mit Verzögerung oder gar nicht mehr. Bisweilen treten heftige Bewegungsabläufe auf; die Fische schießen dann durch das Becken, schnellen über die Wasseroberfläche empor und sinken schließlich regungslos auf den Boden. Ihre Orientierung im Raum ist gestört. Umgebungsreize werden nicht mehr wahrgenommen. Die Fische schwimmen und stoßen gegen die Beckenwände oder an die Belüftungseinrichtung. Ihre Atmung ist unregelmäßig; auf einzelne Atembewegungen erfolgt jeweils ein längerer Atemstillstand. Unmittelbar vor dem Tod sperren sie das Maul weit auf und taumeln dabei durch das Wasser. Bei toten Tieren sind die Kiemendeckel weit gespreizt und das Maul ist aufgerissen. Auffallend ist der rasche Eintritt der Totenstarre.

Bei den hier geprüften Konzentrationen (0,05 ppm - 1,0 ppm) liegt der Zeitpunkt des Absterbens stets im ersten Zehntel der gesamten Versuchszeit (Tab. 14, 15). Überlebende Fische zeigen ein anderes Vergiftungsbild: Zunächst steigt auch bei ihnen die Atemfrequenz an; innerhalb von 24 h ist sie jedoch wieder normal. Danach folgt eine "Lähmungsphase". Die Fische reagieren auf Klopfen an die Scheibe oder auf direkte Berührungsreize mit dem Glasstab nur noch verzögert.

Tab. 15: Salmo gairdneri, Zahl toter Tiere, Eintrittszeiten und Todeszeiten.

Aretit® Konzentration (ppm)	Zahl der Tiere	Zahl toter Tiere nach Stunden (h) 3	6	12	24	96+48	Eintrittszeit (h)	Todeszeit (h)
0,05	6	–	–	–	–	–	–	–
0,075	6	–	–	–	–	–	2	–
0,09	6	–	–	1	1	1	2	3 – 4
0,1	8	2	3	4	4	4	1	3 – 4
0,15	8	3	6	6	6	6	0,5	2,5 – 3,5
0,2	8	8	8	8	8	8	0,33	2,5 – 3,5
0,25	8	8	8	8	8	8	0,33	1,0 – 1,2
0,3	8	8	8	8	8	8	0,2	1,0 – 1,2
1,0	4	4	4	4	4	4	0,16	0,7 – 1,0

Wiedererholung im Frischwasser: Zur Bestimmung der Wiedererholungsrate nach unterschiedlich langer Einwirkung von Aretit® wurden die Fische Konzentrationen von 0,2 und 0,3 ppm ausgesetzt. Anschließend wurden sie in Frischwasser umgesetzt und beobachtet. Das Umsetzen erfolgte jeweils nach Erreichen einer der drei typischen Vergiftungsphasen (siehe Vergiftungsbild).

1. Gruppe: Umsetzen nach der Erhöhung der Atemfrequenz um 50 %.
2. Gruppe: Umsetzen nach erregtem Umherschwimmen an der Wasseroberfläche.
3. Gruppe: Umsetzen nach Umkippen in die Seitenlage.

Bei 0,2 ppm erholten sich 3 Versuchstiere in der ersten Gruppe, allerdings nur, wenn sie schon bei Erhöhung der Atemfrequenz umgesetzt wurden. Für die Fische aus Gruppe 2 und 3 erfolgte in keinem Fall eine Wiedererholung. Bei 0,3 ppm starben in jeder Versuchsgruppe alle Tiere nach dem Umsetzen ab (Tab. 16).

Tab. 16: Salmo gairdneri, Wiedererholung bei 0,2 und 0,3 ppm.

Aretit® Konzentration (ppm)	Versuchs-gruppe	Zahl der Tiere	Zahl abgestorbe-ner Tiere	Zahl wiederer-holter Tiere
0,2	Gruppe 1	5	2	3
	Gruppe 2	5	5	-
	Gruppe 3	5	5	-
0,3	Gruppe 1	5	5	-
	Gruppe 2	5	5	-
	Gruppe 3	5	5	-

Salmo trutta (Salmonidae)

Die Bachforellen wurden bei 15 ± 1 °C Wassertemperatur gehalten. Haltungsgefäße und Fütterung entsprachen denen der Regenbogenforellen. Die Versuche erfolgten in Vollglasbecken (20x20x15 cm), in je 4 l abgestandenem, gut durchlüftetem TLW (Wassertemperatur 10,0 ± 0,2 °C; O_2-Gehalt 8,8 ± 0,4 mg/l; ph-Wert 8,1 ± 0,1; Härte 9 ° dH). Die Adaptationszeit betrug 16 h. Pro Gefäß wurden 3 Fische verwendet (GL 6,0 ± 0,4 cm KL 5,1 ± 0,4 cm; GG 2,3 ± 0,5 g).

Grenzkonzentration	GC:	0,02 ppm ≤ GC < 0,04 ppm
Schwellenkonzentration	SC:	0,02 ppm < SC ≤ 0,04 ppm
letale Konzentration	LC:	0,08 ppm < LC ≤ 0,1 ppm

Tab. 17: Salmo trutta, LC_{50}-Werte.

Versuchs-dauer (h)	LC_{50} (ppm)	95 % Vertrauens-grenzen (ppm)	Gleichung der Probitgeraden y= Probit; x= lg (Dosis)
3	0,14	0,01 und 0,27	y= 26,38 + 24,93 x
6	0,09	0,08 und 0,11	y= 14,14 + 8,78 x
12	0,07	0,06 und 0,07	y= 17,60 + 10,58 x
24	0,06	0,05 und 0,07	y= 15,76 + 8,94 x
96+48	0,06	0,05 und 0,07	y= 15,76 + 8,94 x

Vergiftungsbild: Die Bachforellen zeigten in allen Versuchen das gleiche Vergiftungsbild wie die Regenbogenforellen. Auch die Todeszeiten lagen wie bei Salmo gairdneri innerhalb von 24 h nach Versuchsbeginn (Tab. 18). Der LC_{50} blieb somit nach den ersten 24 h gleich (Abb. 17).

Tab. 18: Salmo trutta, Zahl toter Tiere, Eintrittszeiten und Todeszeiten.

Aretit® Konzentration (ppm)	Zahl der Tiere	Zahl toter Tiere nach Stunden (h) 3	6	12	24	96+48	Eintrittszeit (h)	Todeszeit (h)
0,02	6	-	-	-	-	-	-	-
0,04	6	-	-	-	-	-	-	-
0,05	6	-	-	-	1	1	3	22
0,06	6	-	1	4	4	4	2	6 - 12
0,07	6	-	-	4	4	4	1,5	7 - 12
0,08	6	-	2	4	4	4	1	4 - 10
0,1	6	-	4	6	6	6	0,5	4 - 10
0,2	6	6	6	6	6	6	0,25	1 - 1,5

Thymallus thymallus (Thymallidae)

Die Versuchstiere wurden 10 Tage lang in Rahmenglasaquarien (59x30x 36 cm) mit Innenfilter bei einer Wassertemperatur von 15 ± 1,0 °C gehalten und täglich mit Tubifex gefüttert. Als Versuchsgefäße dienten Vollglasbecken (30x22x24,5 cm) mit 10 l abgestandenem, belüftetem TLW (Wassertemperatur 10,0 ± 0,1 °C; O_2-Gehalt 9,2 ± 0,6 mg/l; ph-Wert 7,6 ± 0,2; Härte 8 °dH). Die Eingewöhnungszeit betrug 16 h, die Zahl der Versuchsfische pro Gefäß 3 (GL 8,9 ± 0,5 cm; KL 7,8 ± 0,4 cm; GG 4,8 ± 0,5 g).

Grenzkonzentration	GC:	0,03 ppm ≦ GC < 0,06 ppm
Schwellenkonzentration	SC:	0,03 ppm < SC ≦ 0,06 ppm
letale Konzentration	LC:	0,09 ppm < LC ≦ 0,12 ppm

Tab. 19: Thymallus thymallus, LC_{50}-Werte.

Versuchs-dauer (h)	LC_{50} (ppm)	95 % Vertrauens-grenzen (ppm)	Gleichung der Probitgeraden y= Probit; x= lg (Dosis)
3	0,14	0,09 und 0,19	y= 9,20 + 4,92 x
6	0,11	0,09 und 0,13	y= 10,22 + 5,42 x
12	0,08	0,07 und 0,08	y= 26,22 + 19,16 x
24	0,08	0,07 und 0,08	y= 26,22 + 19,16 x
96+48	0,08	0,07 und 0,08	y= 26,22 + 19,16 x

Vergiftungsbild: Erste Anzeichen einer Vergiftung (erhöhte Atemfrequenz und Atemtiefe) treten 1-2,5 h nach Versuchsbeginn auf. Vereinzelt schwimmen die Fische mit offenem Maul an die Wasseroberfläche. Mit fortschreitender Vergiftung erfolgen die Bewegungen langsamer; die Fische halten sich dann nur noch in Bodennähe oder direkt am Boden auf. Sie kippen immer wieder in die Seitenlage. Nach etwa 30 Minuten können sie sich nicht mehr in die normale Schwimmlage aufrichten. Die Atemfrequenz und -tiefe steigen noch weiter an und die Kiemendeckel sind stark abgespreizt. In der Druckphase der Atmung wird das Maul nur noch unvollständig geschlossen. Wildes "Umherschießen" im Becken wie bei den Forellen wurde nicht beobachtet, vielmehr bleiben die Äschen bis zum Tod am Beckengrund liegen. Je nach Konzentration tritt der Tod nach 0,5-5 h ein. Die Kiemendekkel sind dann abgespreizt und das Maul ist weit aufgerissen. Die Todeszeiten lagen bei allen untersuchten Konzentrationen innerhalb der ersten 12 h nach Versuchsbeginn.

Tab. 20: Thymallus thymallus, Zahl toter Tiere, Eintrittszeiten und Todeszeiten.

Aretit® Konzentration (ppm)	Zahl der Tiere	Zahl toter Tiere nach Stunden (h) 3	6	12	24	96+48	Eintrittszeit (h)	Todeszeit (h)
0,03	4	-	-	-	-	-	-	-
0,06	4	-	-	-	-	-	2,5	-
0,07	6	-	1	1	1	1	2,5	6
0,08	6	1	2	4	4	4	2,5	4 - 12
0,09	6	1	2	5	5	5	2	4 - 12
0,12	6	4	6	6	6	6	1	2 - 6
0,15	6	2	3	6	6	6	1	2 - 7

Cyprinus carpio (Cyprinidae)

Die Karpfen wurden vor Versuchsbeginn 14 Tage in einem Eternitbecken (80x50x50 cm) bei 20 ± 1,0 °C gehalten. Täglich wurden sie mit Tetramin Großflocken (Tetra-Werke, D-4520 Melle) gefüttert. Die Versuche wurden nach einer 24-stündigen Adaptationszeit in Vollglasbecken (20x20x 15 cm), die mit 4 l abgestandenem, belüftetem TLW gefüllt waren, durchgeführt (Wassertemperatur 10,0 ± 0,1 °C; O_2-Gehalt 8,5 ± 0,5 mg/l; ph-Wert 8,0 ± 0,1; Härte 9 ° dH).

Grenzkonzentration	GC:	0,02 ppm ≤ GC < 0,03 ppm
Schwellenkonzentration	SC:	0,02 ppm < SC ≤ 0,03 ppm
letale Konzentration	LC:	0,11 ppm < LC ≤ 0,13 ppm

Tab. 21: Cyprinus carpio, LC_{50}-Werte.

Versuchsdauer (h)	LC_{50} (ppm)	95 % Vertrauensgrenzen (ppm)	Gleichung der Probitgeraden y= Probit; x= lg (Dosis)
3	-	-	-
6	-	-	-
12	0,28	0,12 und 0,44	y= 6,93 + 3,53 x
24	0,14	0,12 und 0,17	y= 5,12 + 0,17 x
48	0,11	0,09 und 0,14	y= 9,19 + 4,42 x
72	0,10	0,09 und 0,12	y= 10,33 + 5,42 x
96	0,09	0,08 und 0,11	y= 11,86 + 6,63 x
96+48	0,09	0,08 und 0,10	y= 11,77 + 6,48 x

Vergiftungsbild: Karpfen zeigen nach dem Einbringen der Giftsubstanz keinerlei Erregung. Die Atemfrequenz wird nicht erhöht; es treten weder Gleichgewichtsstörungen noch typisches "Luftschnappen" auf. Eine Eintrittszeit der Giftwirkung ist nicht, die Todeszeit nur grob zu ermitteln. Bis zum Tod, der ohne besondere Kennzeichen eintritt, sind keinerlei Verhaltensänderungen genüber den Kontrollen festzustellen. Tote Tiere "stehen" entweder auf den Bauchflossen am Boden oder sie treiben im Wasser und nehmen dabei die normale Körperlage ein. Die Kiemendeckel sind stets angelegt, und der Mund ist geschlossen.

Tab. 22: Cyprinus carpio, Zahl toter Tiere und Todeszeiten.

Aretit® konzentration (ppm)	Zahl der Tiere	Zahl toter Tiere nach Stunden (h)								Todeszeit (h)
		3	6	12	24	48	72	96	96+48	
0,02	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,03	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,05	6	-	-	-	-	1	1	1	1	40
0,06	6	-	-	-	-	1	1	1	1	40
0,07	6	-	-	-	-	1	1	1	1	40
0,08	6	-	-	-	-	1	1	1	1	40 - 97
0,09	6	-	-	-	1	1	1	2	2	20 - 96
0,11	6	-	-	1	2	2	2	3	3	11 - 96
0,13	6	-	-	1	3	5	5	6	6	11 - 96
0,15	6	-	-	2	4	4	5	6	6	11 - 96
0,2	6	-	-	-	3	5	6	6	6	20 - 72
0,7	6	-	-	3	6	6	6	6	6	11 - 22

b) Amphibia

Rana temporaria, Larven (Anura)

Die aus Froschlaich gezüchteten Kaulquappen wurden in 10 l Vollglasaquarien bei 10,0 ± 0,2 °C gehalten. Die Fütterung erfolgte täglich abwechselnd mit Eiweiß, Tetramin (Tetra-Werke, D-4520 Melle), Salat und Spinat. Als Versuchsgefäße dienten Rundglasschalen mit 500 ml abgestandenem, belüftetem TLW (Wassertemperatur 10,0 ± 0,2 °C; O_2-Gehalt 8,8 ± 0,3 mg/l; ph-Wert 8,3 ± 0,2; Härte 10 °dH). Die Zahl der Versuchstiere (GL 29 ± 2 mm) betrug pro Gefäß und Konzentration 10, die Adaptationszeit 24 h. Da der Eintritt des Todes sehr schwer festzustellen war, wurde auf die Angabe von Mortalitätsraten nach 24, 48, 72 und 96 h verzichtet.

Grenzkonzentration	GC:	0,05 ppm ≤ GC < 0,1 ppm
Schwellenkonzentration	SC:	0,05 ppm < SC ≤ 0,1 ppm
letale Konzentration	LC:	0,42 ppm < LC ≤ 0,45 ppm
LC_{50}-Wert (96+48 h)	:	0,38 ppm
95 % Vertrauensgrenzen	:	0,42 ppm und 0,45 ppm
Gleichung der Probitgeraden	:	y= 7,97 + 19,02 x

(y= Probit; x= lg (Dosis)

Vergiftungsbild: Im Laufe der Vergiftung schwimmen die Kaulquappen erregt und pausenlos im Becken umher. Bei Konzentrationen < 0,4 ppm treten nach 15-20 Minuten Lähmungserscheinungen auf. Die Kaulquappen sinken dann entweder erschöpft auf den Grund und bleiben in Rücken- oder Seitenlage liegen, oder sie hängen regungslos an der Wasseroberfläche. Nach einer Erholungspause schwimmen sie erneut umher; ihre Bewegungen werden zunehmend unkoordiniert. Sie rotieren um die Längs- und Hochachse des Körpers. Schließlich tritt eine vollständige Immobilisierung ein (Seitenlage, s-förmig gekrümmter Schwanz). In diesem Zustand können die Kaulquappen noch tagelang überleben. Bringt man sie in Frischwasser, so erholen sie sich wieder. Der Tod durch Vergiftung tritt ohne besondere Anzeichen ein. Genaue Angaben über den Zeitpunkt des Todes sind nicht möglich. Die Todeszeiten lagen in allen Fällen innerhalb der ersten 48 h nach Versuchsbeginn.

Tab. 23: Rana temporaria, Mortalitätsraten, Eintrittszeiten und Todeszeiten.

Aretit® Konzentration (ppm)	Mortalität nach 96+48 h (%)	Eintrittszeit (h)	Todeszeit (h)
0,05	–	–	–
0,1	–	4	–
0,2	–	2	–
0,3	10	2	< 48
0,35	20	2	< 48
0,40	40	1,5	< 48
0,42	80	1	< 48
0,45	100	1	< 48
0,47	100	1	< 48
0,50	100	0,75	< 24
1,0	100	0,5	< 24

IV. Auswirkungen der Intoxikation auf einfache interspezifische Beziehungen innerhalb der Nahrungskette

Material und Methoden

Als Räuber wurden in allen Versuchen Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) verwendet (GL 12,7 ± 0,8 cm; KL 11,0 ± 0,8 cm; GG 16,6 ± 4,0 g). Als Beutetiere dienten Bachflohkrebse (Gammarus fossarum) mit einer Größe von 9-12 mm. Die Forellen wurden in einem 500 l Eternittrog (Wassertemperatur 12 ± 2 °C, LD 12:12 h) gehalten, die Gammariden bei gleichen Bedingungen in 12 l Vollglasbecken (30x22x24,5 cm).

1. Versuche in Aquarien ohne Grundbedeckung

Als Versuchsgefäße dienten 12 l Vollglasaquarien (30x22x24,5 cm), die mit 10 l TLW gefüllt waren. Die Becken waren weder bepflanzt noch hatten sie Grundbedeckung, um den Krebschen keine Versteckmöglichkeiten zu bieten. Zur Vermeidung optischer Reize waren drei Seiten der Becken abgedeckt. Die Frontseite stand zur Beobachtung offen. Die Beleuchtungstärke betrug an der Wasseroberfläche 90-95 Lux. Jedes Testbecken wurde mit einem Fisch besetzt; eine Fanggruppe bestand jeweils aus 5 bzw. 6 Fischen. Nach einer Eingewöhnungszeit von 5-7 Tagen wurden die Forellen erstmals mit Gammariden gefüttert. Jeweils 15 Nährtiere wurden dazu mit einem abgedunkelten Plastikrohr auf den Beckengrund plaziert. Eine Minute später wurde das Rohr hochgezogen. Diese Methode gewährleistete in allen Versuchen gleiche Vorbedingungen (Schneider et al. 1980).

Gemessen wurde jeweils die Zeitspanne (in sec), die die Forelle zum Fangen und Fressen von 5 bzw. 10 Gammariden benötigte (Fangzeit). Nach jedem Versuch wurden die Fische 48 h lang nicht mehr gefüttert, um für jeden Fütterungstag den gleichen Hungerzustand zu erreichen. Dieser läßt sich durch Messen der "handling time" (Zeitraum zwischen Ergreifen der Beute und Schlucken) messen und bleibt bei hungrigen Tieren weitgehend konstant; die "handling time" verlängert sich aber z. B. bei nachlassender Freßlust (Hammons 1981). Bei Kontrollversuchen lag sie stets zwischen 0,1-0,2 sec. Alle Versuche wurden annähernd zur gleichen Tageszeit durchgeführt. Zur Gewöhnung an die speziellen Versuchsanordnungen wurden die Forellen den Untersuchungen von Goodyear (1972) entsprechend so lange dressiert, bis innerhalb einer Fanggruppe jeder einzelne Fisch an drei aufeinanderfolgenden Fütterungstagen Fangzeiten zeigte, die um weniger als 10 sec voneinander differierten. Wenn einer der Fische nach diesem Zeitraum noch zu große Schwankungen aufwies, wurde er durch ein anderes Tier ersetzt. Zu gegebener Zeit wurden die Fische gleichzeitig (jedoch einzeln) in einem 5 l Vollglasaquarium vergiftet. Die Beutetiere wurden ebenfalls in 5 l Aquarien in Gruppen zu je 100 vergiftet. Die Behandlungsdauer wurde so gewählt, daß die bei der akuten Toxizitätsprü-

fung ermittelten Todeszeiten um mindestens 30 h unterschritten und bei subletaler Vergiftung die Eintrittszeit der Giftwirkung unterschritten wurde. Nach der Herbizidbehandlung wurden die Fische in die Testbecken zurückgebracht und eine Stunde später gefüttert. Kontrollversuche hatten gezeigt, daß das Umsetzen der Forellen in die Versuchsbecken nach einer Stunde keine meßbaren Auswirkungen auf die Fangzeiten hat. Die Verwendung ein- und derselben Fanggruppe als Kontroll- wie auch als Testgruppe stellte sicher, daß die Variation in den Fangzeiten der Einzeltiere das Gesamtergebnis nicht beeinflußten. Jeder Fisch liefert hierbei seine eigenen Ausgangswerte. Jede Fanggruppe wurde nur für einen Test verwendet.

Die statistische Auswertung der in den Versuchen ermittelten Fangzeiten erfolgte durch Berechnung von Toleranzgrenzen für jedes einzelne Versuchstier. Die aus den 3 Kontrolltagen stammenden Ausgangsdaten wurden zuerst auf Normalverteilung in einem graphischen Test nach Lilliefors geprüft (Iman 1982). Die aus den Ausgangswerten berechneten Einzelvarianzen wurden anschließend auf Varianzenhomogenität untersucht (Beyer 1968). Nachdem diese in allen Fällen vorlag, konnten die Toleranzgrenzen bei Normalverteilung mit gepoolter Varianz (durchschnittliche Varianz aller Versuchsfische) nach $\bar{x} \pm k \times \sigma$ berechnet werden (Sachs 1979).

2. Versuche in Aquarien mit Grundbedeckung

Der Boden der 12 l Vollglasbecken wurde mit 2000 g Quarzsand (Körner Ø 1-3 mm) 3,5 cm hoch bedeckt. In den Becken lag eine Tonscherbe (6x6 cm), die den Gammariden wie der Quarzsand als Versteck diente. Jedes Becken wurde auf drei Seiten abgedeckt und mit einem Fisch besetzt. 15 Minuten vor Versuchsbeginn wurde eine undurchsichtige Trennscheibe so in das Aquarium eingebracht, daß der Fisch nur noch 2/3 des Beckens als Aufenthaltsraum hatte. In den für den Fisch unzugänglichen Teil wurden nun 20 Gammariden eingesetzt, die sich 15 Minuten lang an die Situation gewöhnen konnten. Dann wurde die Trennscheibe hochgezogen und zuerst die Zeit gemessen, die der Fisch benötigte um 3 Beutetiere zu fangen, ferner die Anzahl der Beutetiere, die in 15 Minuten gefangen wurden (Farr 1977).

Die Gewöhnung der Fische erfolgte in gleicher Weise wie im 1. Versuchsabschnitt. Eine Fanggruppe (jeweils 6 Fische) wurde als ausreichend konditioniert bezeichnet, wenn an 3 aufeinanderfolgenden Fütterungstagen die Fangzeit für die ersten 3 Gammariden kürzer als 50 sec war, und die Gesamtzahl der erbeuteten Krebse in 15 Minuten nicht unter 6 lag. Nicht gefressene Beutetiere wurden nach Versuchsende aus den Becken entfernt. Um zu prüfen, ob durch Anreicherung von Aretit® im Fischorganismus Veränderungen auftreten, wurden in einem Langzeitversuch (23 Fütterungstage) mehrmals vergiftete Gammariden gefüttert.

Die für die ersten 3 Beutetiere ermittelten Fangzeiten wurden wie in den Versuchen ohne Grundbedeckung durch Bestimmung von Toleranzgrenzen statistisch ausgewertet. Zur Signifikanzprüfung der in 15 Minuten gefangenen Nährtiere wurde ein X^2-Test für eine 2x2 Situation herangezogen (Ridgman 1981, Sachs 1979). Für den Langzeitversuch wurde nach vorausgegangener Homogenitätsprüfung der Ausgangswerte (F-Test) zur statistischen Berechnung ebenfalls ein X^2-Test angewendet.

3. Versuche über die Räuber-Beute-Beziehungen in einem simulierten Habitat

Nach einem statischen Testverfahren wurden die Auswirkungen der Vergiftung auch in einem simulierten Habitat untersucht. Die 12 l Vollglasaquarien wurden dazu wieder 3,5 cm hoch mit Quarzkies bedeckt (2000 g pro Becken, Körner Ø 1-3 mm). Auf dem Kies lag eine Tonscherbe (6x6 cm Grundfläche) und ein Stein gleicher Größe. Der Bodengrund wurde an einer Stelle mit Cladophora bepflanzt (10 g Naßgewicht). Auf dem Grund lagen ebenfalls zwei Schwarzerlenblätter (Trockengewicht jeweils 0,5 g). Die Becken wurden mit 8 l TLW gefüllt und kräftig belüftet.

Bei den Kontrollversuchen wurden in jedes Becken 40 Gammariden mit einer Mindestgröße von 4 mm eingesetzt. 6 Tage später kam eine Forelle hinzu, die 24 h im Becken blieb. Dann wurden die überlebenden Krebschen gezählt. Der Kies wurde dazu gesiebt. Bei den Vergiftungsversuchen wurde Aretit® jeweils 24 h nach dem Einsetzen der Krebschen eingebracht, so daß die Vergiftungsperiode 5 Tage betrug, ehe der Fisch eingesetzt wurde. Der weitere Ablauf entsprach dem der Kontrollversuche. Die Forellen wurden entweder im Kontrollversuch oder im Vergiftungsversuch verwendet um Lerneffekte zu vermeiden. Vor Versuchsbeginn wurden sie in 12 l Vollglasaquarien gehalten und mit Gammariden gefüttert.

Die im Kontroll- bzw. Vergiftungsversuch ermittelte Anzahl gefressener Beutetiere wurde in einem χ^2-Test auf signifikante Unterschiedlichkeit getestet.

Ergebnisse

1. Versuche in Aquarien ohne Grundbedeckung

In dieser Versuchsreihe wurden einerseits die Veränderungen der Fangzeiten durch unterschiedlich hohe Konzentration und verschieden lange dauernde Vergiftungen der Räuber, andererseits der Einfluß vergifteter Beute auf das Fangverhalten untersucht. Zur Auswertung der Versuche wurde zusätzlich ein Freßfaktor F herangezogen, der in 3 Formen erscheint. Zur Berechnung diente jeweils die an den mit Ziffern versehenen Fütterungstagen gemessene Fangzeit für 10 Krebse in sec.

$$F_0 = \frac{\text{Fütterungstag 2}}{\text{Fütterungstag 3}}$$

$$F_1 = \frac{\text{Fütterungstag 4 (Behandlungstag)}}{\text{Fütterungstag 3}}$$

$$F_2 = \frac{\text{Fütterungstag 5 (Tag nach der Behandlung)}}{\text{Fütterungstag 3}}$$

F_0 = Ausgangsfaktor
F_1 = Behandlungsfaktor
F_2 = Regenerationsfaktor

Diese Faktoren ermöglichen es die individuell unterschiedliche Schnelligkeit der Fische beim Fang der Beute unberücksichtigt zu lassen. Nur die tägliche Variation der Fänge geht in die Berechnungen ein. Gleicher Zähler und Nenner ergeben einen Quotienten von 1; eine Verlängerung der Fangzeiten an den Fütterungstagen 2, 4 und 5 vergrößert den Quotienten (> 1). Eine Verkürzung der Fangzeiten an den entsprechenden Tagen verkleinert den Quotienten (< 1). Der Ausgangsfaktor F_0 dient als Orientierungswert für die tägliche Variation, der Behandlungsfaktor F_1 ist ein Maß für die nach vorhergehender Vergiftung erfolgte Änderung im Fangverhalten. Der Regenerationsfaktor F_2 erlaubt Rückschlüsse auf die Wiedererholung des Fisches.

Fangverhalten im Kontrollversuch: Sofort nach dem Entfernen des Futterrohres verteilen sich die Krebse am Grund, oder sie schwimmen umher. Letztere werden stets zuerst gefangen. Die Schwimmbewegungen der Gammariden lösen sofort die Fanghandlung aus. Die am Grund des Beckens liegenden Krebschen werden erst später erkannt und gefressen. Auch "fangbereite" Fische benötigen einige Minuten, ehe sie regungslose Futtertiere bemerken. Neben der Bewegung spielt auch die Größe der Futtertiere eine Rolle. In den Versuchen wurden deshalb nur Krebschen verwendet, die > 4 mm waren; bei dieser Größenordnung können die Fische ihre Beute (entsprechend dem jeweiligen Bewegungsverhalten) an jeder Stelle im Aquarium sicher erkennen.

Fangverhalten nach Vergiftung: Im 1. Versuch wurden die dressierten Fische 2 h lang mit 0,1 ppm Aretit® vergiftet, einer Konzentration, die bei der 96 h-Versuchsdauer

Tab. 24: Fangzeiten für 5 bzw. 10 Gammariden (sec) nach vorangegangener 1-stündiger Behandlung des Fisches mit 0,1 ppm.

Fütterungstage	Ausgangswerte 1	2	3	$\bar{x} \pm$ S.D.	Toleranzgrenze	Behandlungstag 4	Tag nach Behandlung 5
Für 5 Gammariden							
Fisch 1	12	10	8	10,0 ± 0,2		368*	11
Fisch 2	12	12	11	11,7 ± 0,6		17	16
Fisch 3	14	13	16	14,3 ± 1,5	$\bar{x} \pm$ 4,8	79*	12
Fisch 4	11	8	10	9,7 ± 1,5		200	11
Fisch 5	10	13	11	11,3 ± 1,5		81*	15
Für 10 Gammariden							
Fisch 1	35	32	34	33,7 ± 1,5		677*	84*
Fisch 2	32	29	34	31,0 ± 1,7		90*	31
Fisch 3	35	37	32	35,3 ± 1,7	$\bar{x} \pm$ 7,3	286*	34
Fisch 4	34	30	32	32,0 ± 2,0		380*	34
Fisch 5	40	39	37	38,7 ± 1,5		278*	40

* Signifikanz bei $P < 0,05$

dem LC_{50}-Wert entspricht. Nach 1-stündiger Behandlung war die Eintrittszeit der Giftwirkung noch nicht erreicht. 1 Stunde später - bei Versuchsbeginn - war die Atemfrequenz der Fische erhöht. Das Fangverhalten veränderte sich nun drastisch: 4 der Fische hielten sich überwiegend am Boden des Beckens auf und sammelten die hier liegenden Krebschen ein. Auf die frei umherschwimmenden Beutetiere reagierten sie dagegen nicht. Nur der Fisch 2 jagte noch gezielt nach den schwimmenden Beutetieren.

Die Fangzeit für 5 Beutetiere war bei 4 Fischen, für 10 Beutetiere sogar bei der gesamten Fanggruppe (5 Fische) signifikant verlängert. Die dazugehörigen Freßfaktoren für 5 Gammariden betrugen im Mittel 15,97 (Abb. 1 und Tab. 24). Bei allen Fischen war die " handling time" um 2-3 sec verlängert und die Zahl der schnellen und sicheren Fänge herabgesetzt. 48 h nach der Aretit®- Behandlung hatte einer der Fische seine ursprüngliche Fangleistung noch nicht wieder erreicht; die vier anderen hatten sich dagegen erholt und zeigten ein normales Fangverhalten (Abb. 1).

Tab. 25: Fangzeiten für 5 bzw. 10 Gamariden (sec).

a) Nach vorangegangener 6-stündiger Behandlung des Fisches mit 0,07 ppm.
b) Nach vorangegangener 12-stündiger Behandlung des Fisches mit 0,07 ppm.

	Ausgangswerte			$\bar{x} \pm$ S.D.	Toleranzgrenze	Behandlungstag	Tag nach Behandlung
Fütterungstage	1	2	3			4	5
a)							
Für 5 Gammariden							
Fisch 1	14	14	19	17,3 ± 2,9		54*	20
Fisch 2	18	12	12	14,0 ± 3,5		45*	13
Fisch 3	20	18	16	18,0 ± 2,0	$\bar{x} \pm$ 8,8	61*	15
Fisch 4	15	13	9	12,2 ± 3,1		62*	20
Fisch 5	10	14	16	13,3 ± 3,1		57*	15
Für 10 Gammariden							
Fisch 1	31	34	35	33,3 ± 2,1		98*	36
Fisch 2	36	37	34	35,7 ± 1,5		45	37
Fisch 3	35	33	35	34,3 ± 1,2	$\bar{x} \pm$ 13,5	94*	32
Fisch 4	38	35	36	36,3 ± 1,5		165*	37
Fisch 5	39	36	45	40,0 ± 4,6		139*	43
b)							
Für 5 Gammariden							
Fisch 1	15	12	13	13,3 ± 1,5		32*	17
Fisch 2	15	15	14	14,7 ± 0,6		12	13
Fisch 3	14	12	15	13,7 ± 1,5	$\bar{x} \pm$ 8,3	34*	11
Fisch 4	16	10	14	13,3 ± 3,1		45*	10
Fisch 5	14	14	23	17,0 ± 5,2		59*	11
Für 10 Gammariden							
Fisch 1	31	34	35	33,3 ± 2,1		98*	36
Fisch 2	36	37	34	35,7 ± 1,5		45	37
Fisch 3	35	33	35	34,3 ± 1,2	$\bar{x} \pm$ 13,5	94*	32
Fisch 4	38	35	36	36,3 ± 1,5		165*	37
Fisch 5	39	36	45	40,0 ± 4,6		139*	43

* Signifikanz bei $P < 0,05$

In Versuch 2-5 (Tab. 25 und 26) wurden Veränderungen der Fangleistung nach unterschiedlich langer Aretit®-Behandlung bei gleicher Konzentration (0,07 ppm) geprüft. Dies entspricht einer subletalen Konzentration. Die größten zeitlichen Veränderungen ergaben sich dabei nach 6-stündiger Vergiftung (Tab. 25a). Alle 5 Versuchsfische zeigten außerhalb der Toleranzgrenzen liegende Fangzeiten. Der Freßfaktor F_1 für 5 Gammariden lag im Mittel bei 4,2, für 10 Beutetiere bei 3,6 (Abb. 1). Auffallend waren die besonders

Tab. 26: Fangzeiten für 5 bzw. 10 Gammariden (sec).

a) Nach vorausgegangener 24-stündiger Behandlung des Fisches mit 0,07 ppm.
b) Nach vorausgegangener 36-stündiger Behandlung des Fisches mit 0,07 ppm.

	Ausgangswerte			$\bar{x} \pm$ S.D.	Toleranz-grenze	Behand-lungstag	Tag nach Behandlung
Fütterungs-tage	1	2	3			4	5
a)							
Für 5 Gammariden							
Fisch 1	15	12	12	13,3 ± 1,5		20	13
Fisch 2	12	11	11	11,3 ± 0,6		18	12
Fisch 3	16	14	11	13,7 ± 2,5	$\bar{x} \pm$ 8,8	45*	16
Fisch 4	11	15	10	12,0 ± 2,7		30*	19
Fisch 5	19	15	16	16,7 ± 2,1		34*	17
Für 10 Gammariden							
Fisch 1	30	33	34	32,3 ± 2,1		49*	32
Fisch 2	37	34	33	34,7 ± 2,1		54*	38
Fisch 3	36	37	36	36,3 ± 0,6	$\bar{x} \pm$ 13,9	70*	33
Fisch 4	34	27	35	32,0 ± 4,4		59*	32
Fisch 5	43	38	44	41,7 ± 3,2		75*	49
b)							
Für 5 Gammariden							
Fisch 1	14	10	10	11,3 ± 2,3		11	14
Fisch 2	12	16	12	13,3 ± 2,3		13	12
Fisch 3	15	19	14	16,0 ± 2,6	$\bar{x} \pm$ 11,6	16	15
Fisch 4	18	21	16	18,3 ± 2,5		16	19
Fisch 5	9	11	13	11,0 ± 2,0		11	11
Für 10 Gammariden							
Fisch 1	31	34	40	36,0 ± 3,5		38	38
Fisch 2	41	39	38	39,3 ± 1,5		42	43
Fisch 3	45	40	43	42,7 ± 2,5	$\bar{x} \pm$ 17,5	40	46
Fisch 4	36	44	40	40,0 ± 4,0		37	42
Fisch 5	34	30	32	32,0 ± 2,0		30	28

* Signifikanz bei $P < 0,05$

langen Pausen zwischen den einzelnen Fanghandlungen. Einen Tag nach der Behandlung war jedoch bei allen Fischen das Fangverhalten wieder normal (F_2 für 5 Beutetiere 1,25, für 10 Beutetiere 1,03).

Nach 12 h Einwirkung zeigten jeweils 4 Fische für den Fang von 5 bzw. 10 Krebschen verlängerte Fangzeiten; nach 24 h Einwirkungszeit benötigten 3 Fische bei 5 Krebschen und 5 Fische bei 10 Krebschen längere Fangzeiten. Die durchschnittlichen Fangzeiten für 10 Beutetiere verkürzten sich jedoch von 136 sec (6 h Aretit® -Behandlung) auf 108 sec

(12 h Beh.) bzw. 61 sec (24 h Beh.). Der Freßfaktor F_1 verringerte sich von 3,6 über 2,9 auf 1,8 (Tab. 25b, 26a, Abb. 1). Auch im Fangverhalten war nach 24 h gegenüber den Kontrollen kein Unterschied mehr festzustellen. Der Regenerationsfaktor F_2 war in allen Fällen dem Ausgangsfaktor F_0 ähnlich (Abb. 1).
Nach 36 h Herbizid-Einwirkung waren keine Veränderungen gegenüber den Kontrollen mehr zu erkennen. Alle Fangzeiten lagen innerhalb der Toleranzgrenzen, der Freßfaktor $F_{0,1,2}$ lag in allen Fällen im Bereich von 1 (Abb. 1). Die "handling time" war auf 0,1-0,2 sec zurückgegangen. Im Fangverhalten konnten keinerlei Anzeichen einer Vergiftung mehr beobachtet werden (Tab. 26b).

Im Versuch 6 (Tab. 27) wurden die Beutetiere einer 24-stündigen Aretit®-Behandlung mit 0,03 ppm unterzogen. Die lokomotorische Aktivität der Krebschen war danach äußerst gering. Die Tiere schwammen nicht mehr im freien Wasser umher. Die Forellen bemerkten die am Boden liegende Beute nur selten, auch wenn sie nur wenige cm davon entfernt waren. Gelegent-

Tab. 27: Fangzeiten für 5 bzw. 10 Gammariden (sec) nach vorausgegangener 24-stündiger Behandlung der Nährtiere mit 0,03 ppm.

Fütterungstage	Ausgangswerte 1	2	3	$\bar{x} \pm$ S.D.	Toleranzgrenze	Behandlungstag 4	Tag nach Behandlung 5
Für 5 Gammariden							
Fisch 1	11	13	11	11,7 ± 1,2		492*	14
Fisch 2	13	14	12	13,0 ± 1,0		269*	12
Fisch 3	18	21	16	18,3 ± 2,5	$\bar{x} \pm 5,4$	253*	12
Fisch 4	13	18	11	14,0 ± 3,6		249*	19
Fisch 5	10	13	15	12,7 ± 2,5		63*	14
Für 10 Gammariden							
Fisch 1	35	37	33	35,0 ± 2,0		816*	36
Fisch 2	34	34	37	35,0 ± 1,7		662*	29
Fisch 3	18	21	16	18,3 ± 2,5	$\bar{x} \pm 8,3$	310*	43
Fisch 4	36	37	29	34,0 ± 4,4		334*	38
Fisch 5	34	32	37	34,3 ± 2,5		134*	38

* Signifikanz bei $P < 0,05$

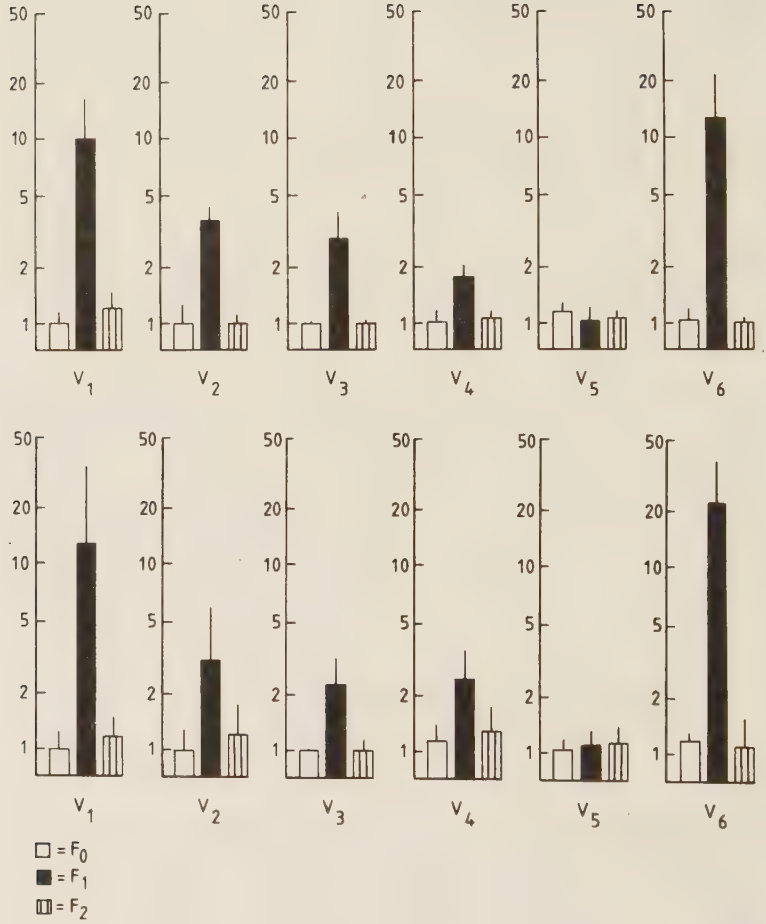


Abb. 1: Durchschnittliche Freßfaktoren der Fanggruppe in 6 Versuchen mit Standardabweichungen (n = 5). Auf der Ordinate ist die Größe der jeweiligen Faktoren logarithmisch abgetragen, auf der Abszisse die jeweiligen Faktoren. F_0 = Ausgangsfaktor, F_1 = Behandlungsfaktor, F_2 = Regenerationsfaktor.

lich wurden die Krebschen durch Schwanzschläge am Grund aufgewirbelt und anschließend gefangen. Der die Fanghandlung auslösende Bewegungsreiz fehlte. Die Fangzeiten zum Fang von 5 Gammariden waren 21,9 fach (bei 10 Gammariden 12,8 fach) verlängert. Das Fressen der vergifteten Krebschen hatte auf die Fische jedoch keine nachteilige Wirkung (siehe F_2 in Abb. 1).

2. Versuche in Aquarien mit Grundbedeckung

Durch die Bedeckung des Bodens mit feinem Kies war für die Fische das Erkennen und Fangen der Beute erheblich erschwert. Die Krebschen konnten sich durch rasche Flucht zwischen die Steinchen den Fischen entziehen. Nach der 15 minütigen Eingewöhnungszeit wurden die Trennscheiben hochgezogen; die Fische jagten dann sofort nach den Gammariden.

In Tab. 28a-d und Abb. 2 sind die ermittelten Fangzeiten für je 3 Krebschen mit Angabe der Toleranzgrenzen, bzw. die durchschnittliche Anzahl erbeuteter Krebschen in 15 Minuten dargestellt.

Versuchsreihe 1: In der ersten Versuchsreihe wurden die Beutetiere 24 h mit 0,03 ppm Aretit® behandelt. Ihre Aktivität blieb gering. Nach dem Einsetzen der Beutetiere in das Versuchsbecken wühlten sie sich sofort in den feinen Kies ein oder versteckten sich unter der Tonscherbe. Nach Entfernen der Trennscheibe suchten die Fische sofort nach der Beute, konnten aber nur selten einen Gammarus fangen. Im Vergleich zu dem vorausgehenden 3. Fütterungstag (Fangzeit 27,5 $\pm$ 5,2 sec) stieg die Fangzeit signifikant auf durchschnittlich 698,8 $\pm$ 208 sec an. Entsprechend verminderte sich die Zahl der gefangenen Beutetiere in 15 Minuten. Während sie am 3. Dressurtag noch 9,2 $\pm$ 1 betrug, sank sie nach der Vergiftung auf 3,3 $\pm$ 0,5, was einer

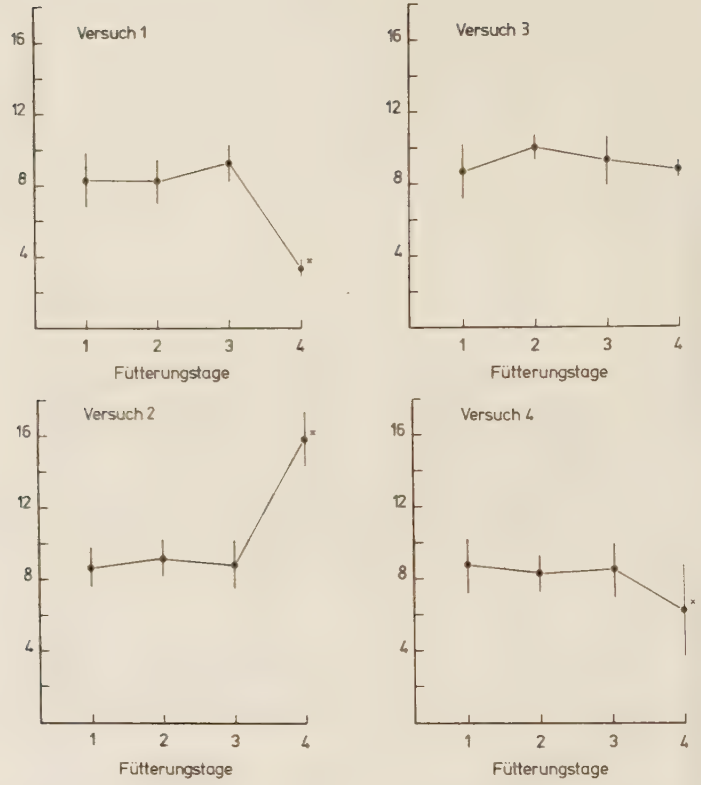


Abb. 2: Durchschnittliche Anzahl erbeuteter Krebschen innerhalb von 15 Minuten (3 Kontrolltage, anschliessend Behandlungstag = Fütterungstag 4). Auf der Ordinate ist die Zahl der gefangenen Beutetiere abgetragen; n = 6, x = Signifikanz bei P < 0,05. Vorausgehend wurden:

a) die Krebschen 24 h mit 0,03 ppm Aretit® behandelt.
b) die Krebschen 1 h mit 0,08 ppm Aretit® behandelt.
c) die Fische 24 h mit 0,03 ppm Aretit® behandelt.
d) die Fische 24 h mit 0,07 ppm Aretit® behandelt.

Tab. 28: Fangzeiten für 3 Gammariden (sec).

a) Nach vorangegangener 24-stündiger Behandlung der Nährtiere mit 0,03 ppm.
b) Nach vorangegangener 1-stündiger Behandlung der Nährtiere mit 0,08 ppm.
c) Nach vorangegangener 24-stündiger Behandlung der Fische mit 0,03 ppm.
d) Nach vorangegangener 24-stündiger Behandlung der Fische mit 0,07 ppm.

	Fütterungstage	Ausgangswerte 1	2	3	$\bar{x} \pm$ S.D.	Toleranzgrenze	Behandlungstag 4	Tag nach Behandlung 5
a)	Fisch 1	32	34	32	29,3 ± 6,4		741*	38
	Fisch 2	14	20	16	16,6 ± 3,1		870*	12
	Fisch 3	36	30	32	32,6 ± 3,1	$\bar{x} \pm$ 37,7	890*	30
	Fisch 4	22	25	27	24,6 ± 2,5		320*	27
	Fisch 5	20	32	26	26,0 ± 6,0		632*	31
	Fisch 6	28	25	24	25,7 ± 2,1		740*	41
b)	Fisch 1	24	23	22	23,3 ± 1,2		16	38
	Fisch 2	17	14	21	17,3 ± 3,5		10	22
	Fisch 3	19	16	20	18,3 ± 2,1	$\bar{x} \pm$ 10,5	10	15
	Fisch 4	28	29	25	27,3 ± 2,1		10*	26
	Fisch 5	40	38	42	40,0 ± 2,0		14*	36
	Fisch 6	19	22	19	20,0 ± 1,7		11	21
c)	Fisch 1	36	29	32	32,3 ± 3,5		28	38
	Fisch 2	42	40	47	43,0 ± 3,6		39	41
	Fisch 3	21	23	26	23,3 ± 2,5	$\bar{x} \pm$ 24,1	19	19
	Fisch 4	19	17	25	20,3 ± 4,2		28	27
	Fisch 5	36	32	30	32,7 ± 3,1		32	38
	Fisch 6	18	12	16	15,3 ± 3,1		19	15
d)	Fisch 1	18	22	16	18,7 ± 3,1		210*	19
	Fisch 2	26	25	24	25,0 ± 1,0		68*	32
	Fisch 3	24	32	43	30,0 ± 5,3	$\bar{x} \pm$ 32,7	24	26
	Fisch 4	24	30	28	27,3 ± 3,1		23	33
	Fisch 5	30	20	26	25,3 ± 5,0		34	23
	Fisch 6	32	26	29	29,0 ± 3,0		69*	40

* Signifikanz bei $P < 0,05$

hochsignifikanten Verringerung entspricht ($\chi^2 = 65,30$; Tab. 28a, Abb. 2).

Versuchsreihe 2: In der 2. Versuchsreihe (Tab. 28b, Abb. 2) wurden die Krebschen 1 h lang mit 0,08 ppm Aretit® behandelt; diese Konzentration führte noch nicht zu sichtbaren Veränderungen des Verhaltens. Trotzdem wurden die Beutetiere schneller und in größerer Zahl gefressen als an den vorausgehenden Kontrolltagen. Während die Fangzeit am 3. Dressurtag 24,8 ± 8,7 sec und die Gesamtzahl der Fänge

8,8 ± 1,2 betrug, sank die Fangzeit nach der Vergiftung auf 11,7 ± 2,7 sec (2 Werte lagen außerhalb der Toleranzgrenzen), die Zahl der gefangenen Krebschen aber stieg signifikant auf 15,8 ± 1,5 (χ^2 = 38,94). Der Freßfaktor F_1 betrug im Mittel 0,50 ± 0,14 (Abb. 3).

Versuchsreihe 3 und 4: In diesen beiden Versuchsreihen wurden die Fische 24 h lang mit 0,03 und 0,07 ppm Aretit® - Konzentrationen behandelt. Bei 0,03 ppm ergaben sich keine signifikanten qualitativen oder quantitativen Veränderungen im Beutefangverhalten (χ^2 = 0,07). Bei 0,07 ppm waren die Fangleistungen teilweise nachhaltig verändert. 3 der

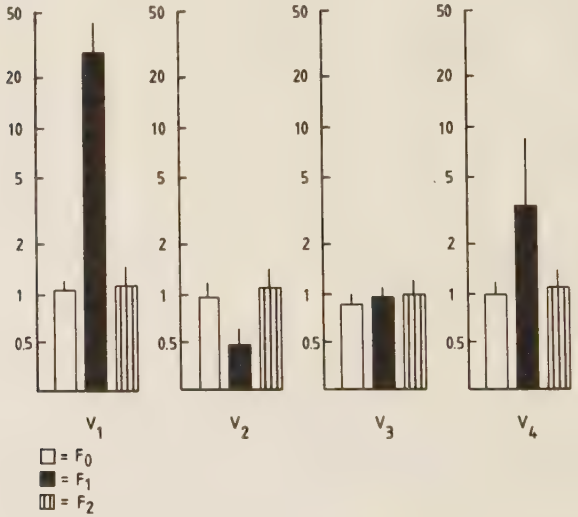


Abb. 3: Durchschnittliche Freßfaktoren der Fanggruppe in 4 Versuchen mit Standardabweichungen (n = 6). Auf der Ordinate ist die Größe der jeweiligen Faktoren logarithmisch abgetragen, auf der Abszisse die jeweiligen Faktoren. F_0 = Ausgangsfaktor, F_1 = Behandlungsfaktor, F_2 = Regenerationsfaktor.

6 Fische reagierten mit einer verzögerten Fangbereitschaft (Fisch 1,2 und 6; Tab. 28d). Sie zeigten auch signifikant verlängerte Fangzeiten. Auch das Herausholen der Beute aus dem Kies bereitete den Fischen Schwierigkeiten. Die "handling time" war gegenüber den bei den Kontrollversuchen ermittelten Werten (0,1-0,2 sec) bis zu 8 sec verlängert. Der Freßfaktor F_1 betrug durchschnittlich 3,4 $\pm$ 4,8 (Abb. 3). Die hohe Standardabweichung erklärt sich aus der individuell sehr unterschiedlichen Reaktion der Fische auf die Behandlung. Die Gesamtzahl erbeuteter Gammariden war bei der Fanggruppe signifikant erniedrigt (χ^2 = 4,17, Abb. 2d).

Versuchsreihe 5: Mit den gleichen Methoden wurde geprüft ob sich das Fangverhalten der Fische nach mehrfacher Fütterung vergifteter Krebschen verändert (Abb. 4,5). Dazu erhielten 6 Fische nach einer Dressurphase von 6 Fütterungstagen am Tag 7, 11 und 15 je 20 Krebschen, die einer 1-stündigen Behandlung mit 0,08 ppm Aretit® ausgesetzt waren. Ausgewertet wurde die Zahl der Beutetiere, welche jeweils in 15 Minuten gefangen wurden. Nachdem sich die Fanggruppe als homogen erwies, konnten die Fütterungstage 4, 5 und 6 mit dem jeweiligen Behandlungstag und dem unmittelbar folgenden Kontrolltag verglichen werden. Es zeigte sich, daß an den Fütterungstagen 7, 11 und 15 (jeweils Fütterung vergifteter Beutetiere) die Fanggruppe signifikant mehr Krebschen fing als an den anderen Tagen (Tab. 29). Das Fangverhalten blieb jedoch auch nach dreimaliger Verfütterung von vergifteten Tieren normal (siehe χ^2-Werte der darauffolgenden Kontrolltage). Am 19. Fütterungstag wurden auch die Fische 12 h lang mit Aretit® (0,07 ppm) vergiftet. Außer einer erhöhten Atemfrequenz waren keine Veränderungen festzustellen; die Fanghandlungen waren jedoch drastisch gestört. Bei der Suche nach den Beutetieren gruben die Fische wahllos in dem Bodengrund und entdeckten dabei die Gammariden nur durch Zufall. Die Beutetiere wurden dann bis zu 10 sec im Maul transpor-

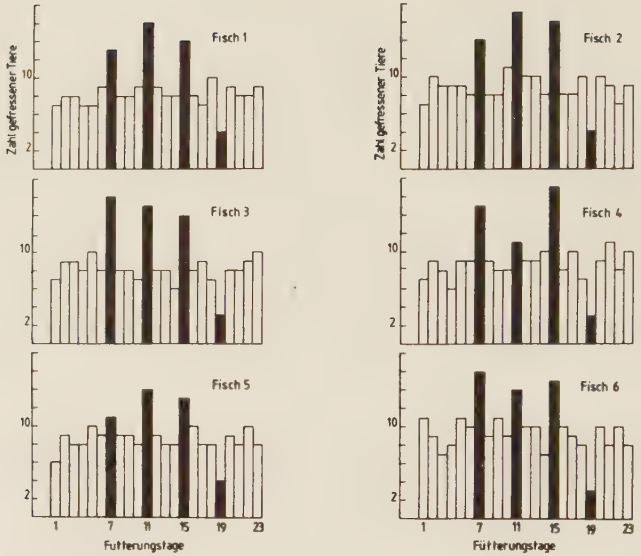


Abb. 4: Anzahl gefangener Krebschen (Ordinate) in je 15 Minuten an 23 aufeinanderfolgenden Fütterungstagen (Abszisse). An den Fütterungstagen 7, 11 und 15 wurden mit Aretit® behandelte Krebschen (0,08 ppm 1 h) gefüttert; am Fütterungstag 19 wurden die Fische vorausgehend mit Aretit® behandelt. Schwarze Säulen: Behandlungstage, weiße Säulen: Kontrolltage.

tiert und schließlich geschluckt. Immer wieder sanken die Fische erschöpft zu Boden. Trotz dieser nachhaltigen Verhaltensstörung war das Fangverhalten bereits am nächsten Fütterungstag (Tag 20) wieder normal (Abb. 4,5; Tab. 29).

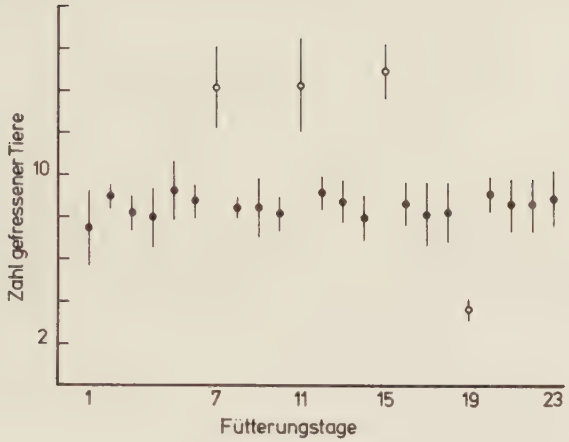


Abb. 5: Mittelwerte ± Standardabweichungen der in Abb. 4 dargestellten Einzelwerte von 6 Versuchsfischen. Sonstige Bezeichnungen wie in Abb. 4.

Tab. 29: χ^2-Werte und ihre Signifikanz (P < 0,05) an den in Abb. 5 dargestellten Behandlungs- (7,11,15 und 19) und Wiedererholungstagen (8,12,16 und 20).

Fütterungstag		χ^2-Wert	Signifikanz
7	(1. Behandlung)	26,14	P < 0,05
8	(1. Wiedererholung)	0,00	N.S.
11	(2. Behandlung)	27,78	P < 0,05
12	(2. Wiedererholung)	0,14	N.S.
15	(3. Behandlung)	29,47	P < 0,05
16	(3. Wiedererholung)	0,01	N.S.
19	(4. Behandlung)	23,05	P < 0,05
20	(4. Wiedererholung)	0,14	N.S.

3. Versuche über die Räuber-Beute-Beziehungen in einem simulierten Habitat

In Tab. 30 sind die Ergebnisse für den Kontrollversuch und 2 Aretit®-Behandlungen zusammengefaßt. In beiden Fällen, wo das Dinitrophenolderivat zugesetzt wurde, war die Zahl der überlebenden Beutetiere größer als im Kontrollversuch. Schon bei einer Konzentration von 0,00001 ppm war die Zahl der überlebenden Beutetiere signifikant größer als im Kontrollversuch (χ^2-Wert = 10,56). Dieses Ergebnis verdeutlichte sich noch bei 0,00005 ppm (χ^2 = 37,0).

Tab. 30: Zahl überlebender Gammariden und Überlebensraten im simulierten Habitat.

Zahl der Tiere pro Versuchsbecken		Kontrollversuch Überlebende Tiere Anzahl	%	0,00001ppm Überlebende Tiere Anzahl	%	0,00005ppm Überlebende Tiere Anzahl	%
1. Becken	40	16	40	18	45	24	60
2. Becken	40	10	25	19	47,5	27	67,5
3. Becken	40	12	30	24	60	27	67,5
4. Becken	40	14	35	22	55	21	52,5
5. Becken	40	14	35	16	40	29	72,5
$\bar{x}$ (1,2,3,4,5)		13,2	33	19,8*	49,5	25,6*	64
S.D. ±		2,3	5,8	3,2	8	3,1	7,8

* Signifikanz bei $P < 0,05$

V. Fluchtreaktionen von Amphibienlarven und Fischen bei verschiedenen Aretit®-Konzentrationen

Material und Methoden

Um eine Reaktion von nicht dressierten Tieren gegenüber "sauberem" Wasser und Aretit®-enthaltendem Wasser zu erhalten, wurde eine U-förmige Rinnenanlage aus PVC gebaut (modifiziert nach Hansen 1969 und Folmar 1976). Die Apparatur ist in Abb. 6 dargestellt. Die Wassertiefe betrug 7,5 cm, der Zufluß aus den Vorratsgefäßen (V1,2) 300 ml/min. Beide Vorratsgefäße wurden belüftet (L). Über die 4 Abflüsse (A1-4) wurde das Wasser bzw. die Giftlösung abgeleitet. Ein rasches Abfließen wurde durch Zuschalten einer Wasserstrahlpumpe (W) erreicht. 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in den Aufenthaltsbereich (zwischen S1 und S3) eingesetzt. Während dieser Zeit waren die 2 Arme durch Schieber S1 und S3 (Metallschieber aus V2A-Stahl) verschlossen. Aus beiden Zuflüssen (Z1,2) strömte TLW. Bei Versuchsbeginn floß in den einen Arm Aretit®-enthaltendes Wasser, in den anderen "normales" Wasser. Die Schieber wurden geöffnet, und die Testtiere konnten in beide Arme schwimmen. Vorversuche mit Farblösungen haben gezeigt, daß beide "Flüssigkeiten" im Abflußbereich getrennt bleiben.
Eine Stunde nach Versuchsbeginn wurde der Mittelschieber S2 geschlossen und die Zahl der Tiere in der Giftlösung bzw. im TLW gezählt (Standardisierung nach Giattina und Garton 1983). Die Versuche wurden bei jeder Konzentration 3 mal mit jeweils 20 Amphibienlarven bzw. 10 Testfischen wiederholt. Vorversuche ergaben, daß die Versuchsfische keinen Arm der Rinnenanlage bevorzugten. Zur Sicherheit wurden jedoch nach jedem Versuchsdurchgang die Zuflüsse von Giftlösung und Wasser getauscht. Nach jedem Test wurde die Anlage 30 min mit RBS-Lösung gespült. Bei jeder Tierart wurde mindestens eine subletale Konzentration verwendet, die noch keine, oder eine erst nach mehreren Stunden auftretende Schädigung hervorruft. Daneben wurden 1-2 hochtoxische Konzentrationen benutzt.

Die Fluchtreaktion der Amphibien und Fische gegenüber Aretit® wurde statistisch durch einen chi-Quadrat Anpassungstest geschätzt (Sachs 1979). Dabei galt die Voraussetzung, daß die Versuchstiere - könnten sie zwischen Giftlösung und TLW nicht unterscheiden - mit gleicher Häufigkeit in beide Arme der Versuchsanlage schwimmen. Durch folgende Formel kann die durchschnittliche Fluchtreaktion quantifiziert werden (verändert nach Scherer 1975)

$$\text{Fluchtreaktion (\%)} = 2x \text{ (Prozentsatz der Tiere im sauberen Wasser} - 50\%)$$

Sind also 50 % der Versuchstiere im giftfreien Arm - ein Resultat, welches sich bei rein zufälliger Verteilung im Mittel ergibt - beträgt die Fluchtreaktion 0 %. 100 % der Testtiere im "sauberen" Wasser bedeutet eine 100 %ige Fluchtreaktion. Die Fluchtreaktion erreicht bei mehr als 44 % eine Signifikanz von $P < 0,05$ ($\chi^2 > 3,84$). Eine etwaige Präferenz bestimmten Giftkonzentrationen gegenüber läßt sich durch eine negative Fluchtreaktion feststellen.

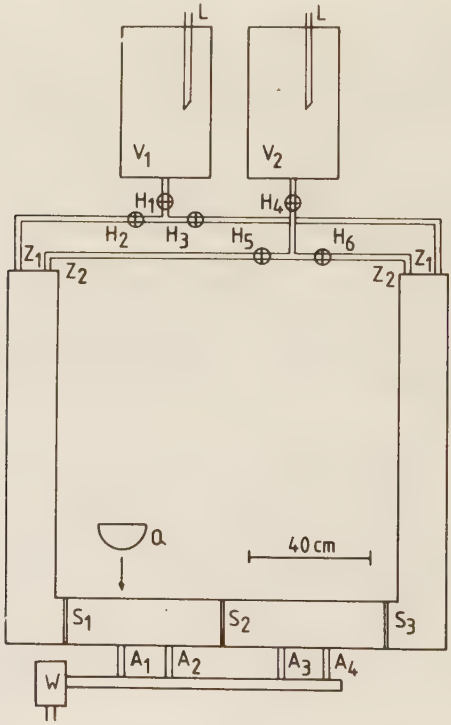


Abb. 6: Rinnenanlage zur Registrierung von Fluchtreaktionen bei Amphibien und Fischen.

A 1-4 = Abflüsse,
H 1-6 = Einweghähne,
L = Belüftung,
Q = Querschnitt der Rinne,
S 1-3 = Schieberegler,
V 1 = Vorratsgefäß mit Giftlösung, Vol. 60 l,
V 2 = Vorratsgefäß mit TLW, Vol. 100 l,
Z 1 = Zuleitung Giftlösung,
Z 2 = Zuleitung TLW,
W = Wasserstrahlpumpe.

Ergebnisse

1. Versuche mit Larven von Rana temporaria

Die Versuche mit Amphibienlarven (GL 2,8 ± 0,3 cm) wurden bei 10,0 ± 0,2 °C durchgeführt. Getestet wurden die Konzentrationen 0,1, 0,5, 3 und 10 ppm. In keinem Fall konnte eine Fluchtreaktion festgestellt werden. Selbst bei 10 ppm - die Kaulquappen zeigten hier schon nach 15 min schwere Vergiftungserscheinungen - trat kein Fluchtverhalten auf.

Tab. 31: Fluchtreaktionen von Kaulquappen (Rana temporaria) gegenüber 4 verschiedenen Aretit®-Konzentrationen. Pro Versuch wurden 20 Individuen verwendet ($\bar{x}$ = Mittelwert aus 4 Versuchen; S.D. = Standardabweichung; N.S. = nicht signifikant bei P < 0,05).

Aretit® Konzentration (ppm)		Zahl der Kaulquappen in Pestizidlösung	in "sauberem" Wasser	Fluchtreaktion[1] (%)	Mortalität (%)	χ^2-Wert bei Signifikanz (P < 0,05)
0,1		8	12		-	
		8	12		-	
		12	8		-	
		9	11			
	$\bar{x}$	9,25	10,75	7,4	-	N.S.
	± S.D.	1,90	1,90			
0,5		5	15		-	
		12	8		20	
		10	10		15	
		13	7		25	
	$\bar{x}$	10,0	10,0	0	15,0	N.S.
	± S.D.	3,55	3,55		10,8	
3,0		9	11		30	
		12	8		50	
		7	13		40	
		11	9		30	
	$\bar{x}$	9,75	10,25	2,5	37,5	N.S.
	± S.D.	2,21	2,21		9,57	
10,0		4	16		70	
		13	7		60	
		9	11		60	
		9	11		75	
	$\bar{x}$	8,75	11,25	12,5	66,25	N.S.
	± S.D.	3,68	3,68		7,5	

[1] Mittelwert aus 4 Versuchen

Die Tiere blieben in den anfangs gewählten Aufenthaltsbereichen und starben bei der hohen Konzentration zum Teil schon während der Versuchszeit. Auch bei 3 bzw. 5 ppm waren die Ergebnisse ähnlich. Bei Einleitung der subletalen Konzentration 0,1 ppm (Eintrittszeit ungefähr 4 h) konnte im Verhalten der Tiere zwischen der Giftseite und der giftfreien Seite kein Unterschied festgestellt werden (Tab. 31).

2. Versuche mit Regenbogenforellen (Salmo gairdneri)

Regenbogenforellen (GL 13,1 ± 0,7 cm; GG 24,3 ± 3,2 g) zeigten gegenüber 3 der getesteten Konzentrationen nach 60 min eine Fluchtreaktion. Sie betrug bei 5 ppm 95 %, bei 0,5 ppm noch 60 % (Tab. 32). Die Mortalitätsrate lag hier jedoch schon bei 10-40 %. Bei 0,05 ppm trat keine Fluchtreaktion auf (5 %).
Um zu prüfen, zu welchem Zeitpunkt das Fluchtverhalten auftritt, wurde in den 1-stündigen Versuchen alle 5 min die Zahl der Fische im Giftschenkel registriert. Ferner wurde die Eintrittszeit der Giftwirkung ermittelt, die im Vergleich zu den Toxizitätsuntersuchungen verlängert war, da sich die gewünschte Konzentration in der Rinne erst nach einigen Minuten einstellte. In den Fällen, in denen die Eintrittszeit der Giftwirkung noch innerhalb der Versuchszeit lag (0,5, 1 und 5 ppm), reagierten die Fische mit Flucht. Diese erfolgte stets nach Auftreten erster sichtbarer Schädigung (erhöhte Atemfrequenz, Gleichgewichtsstörungen).
Bei 5 ppm (erhöhte Atmung nach 7-8 min) trat die Fluchtreaktion nach 15 min ein und wurde nach 25 min signifikant (Abb. 7). Verzögert folgte die Reaktion bei 1 ppm. Bei 0,5 ppm (Eintrittszeit der Giftwirkung 35 min) mieden die Regenbogenforellen nach 45 min deutlich den Pestizidenthaltenden Schenkel. Fische die durch den langen Aufent-

halt in dem kontaminierten TLW massiv geschädigt waren, schwammen (auch in Seitenlage) teilweise nach bereits erfolgter Fluchtreaktion wieder in das Gift zurück und starben dort.

Bei 0,05 ppm zeigten die Forellen auch nach 60 min keine erkennbare Veränderung des Verhaltens. Der Aufenthalt im Aretit®-enthaltenden Arm war zu keinem Versuchszeitpunkt signifikant geringer als im unbehandelten Schenkel (Abb. 7).

Tab. 32: Fluchtreaktionen von Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) gegenüber 4 verschiedenen Aretit®-Konzentrationen. Pro Versuch wurden 10 Individuen verwendet ($\bar{x}$ = Mittelwert aus 4 Versuchen; S.D. = Standardabweichung; N.S.= nicht signifikant bei P < 0,05).

Aretit® Konzentration (ppm)	Zahl der Fische in Pestizidlösung	Zahl der Fische in "sauberem" Wasser	Fluchtreaktion[1] (%)	Mortalität (%)	χ^2-Wert bei Signifkanz (P < 0,05)
0,05	4	6		-	
	7	3		-	
	3	7		-	
	5	5		-	
$\bar{x}$	4,75	5,25	5	-	N.S.
± S.D.	1,70	1,70			
0,5	2	8		30	
	2	8		30	
	3	7		30	
	1	9		10	
$\bar{x}$	2,0	8,0	60	25	7,2
± S.D.	0,82	0,82		10	
1,0	1	9		50	
	0	10		30	
	1	9		40	
	0	10		20	
$\bar{x}$	0,5	9,5	90	35	16,2
± S.D.	0,58	0,58		12,9	
5,0	1	9		50	
	0	10		20	
	0	10		40	
	0	10		40	
$\bar{x}$	0,25	9,75	95	37,7	18,05
± S.D.	0,5	0,5		12,6	

[1] Mittelwert aus 4 Versuchen

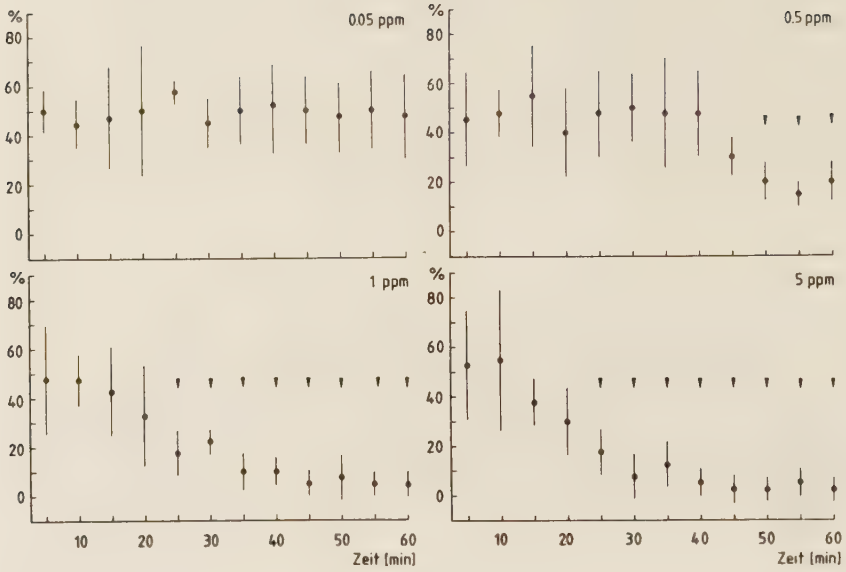


Abb. 7: Fluchtverhalten von Regenbogenforellen im zeitlichen Verlauf gegenüber 4 verschiedenen Aretit®-Konzentrationen. Auf der Ordinate ist der Anteil der Tiere in % aufgetragen, die sich zum angegebenem Zeitpunkt im Aretit®-haltigen Arm befanden. Die Pfeile (↓) geben ein signifikantes Fluchtverhalten an ($\chi^2 > 3{,}8$; $P < 0{,}05$).

3. Versuche mit Tilapien (Sarotherodon leucostictus)

Tilapien (GL 4,2 ± 0,4 cm; GG 1,3 ± 0,4 g) wurden mit den folgenden Aretit®-Konzentrationen behandelt: 0,05, 0,1, 0,5 und 5 ppm. Die Wassertemperatur betrug für diese Warmwasserfische 26 ± 1 °C. Die Tiere zeigten weder bei 0,05 ppm noch bei 0,1 ppm nach 1 h eine signifikante Fluchtreaktion (5 bzw. 0 %). Bei 0,5 und 5,0 ppm mieden sie das Herbizid nach 1 h (75 bzw. 85 %; Tab. 33). Auch hier wurde die Zahl der Fische im kontaminierten Schenkel der Versuchsanlage alle 5 min registriert. Die Ergebnisse entsprachen

Tab. 33: Fluchtreaktionen von Tilapien (Sarotherodon leucostictus) gegenüber 4 verschiedenen Aretit®-Konzentrationen. Pro Versuch wurden 10 Individuen verwendet ($\bar{x}$ = Mittelwert aus 4 Versuchen; S.D. = Standardabweichung; N.S. = nicht signifikant bei P < 0,05).

Aretit® Konzentration (ppm)		Zahl der Fische in Pestizidlösung	Zahl der Fische in "sauberem Wasser	Fluchtreaktion (%)	Mortalität (%)	χ^2-Wert bei Signifikanz (P < 0,05)
0,05		3	7		–	
		8	2		–	
		4	6		–	
		4	6		–	
	$\bar{x}$	4,75	5,25	5	–	N.S.
	± S.D.	2,21	2,21			
0,1		5	5		–	
		6	4		–	
		5	5		–	
		4	6		–	
	$\bar{x}$	5,0	5,0	0	–	N.S.
	± S.D.	0,81	0,81			
0,5		2	8		20	
		0	10		40	
		1	9		10	
		2	8		10	
	$\bar{x}$	1,25	8,75	75	20	11,25
	± S.D.	0,96	0,96		17,32	
5,0		0	10		40	
		2	8		50	
		1	9		30	
		0	10		30	
	$\bar{x}$	0,75	9,25	85	37,7	14,49
	± S.D.	0,95	0,95		9,75	

[1] Mittelwert aus 4 Versuchen

den Versuchen mit Regenbogenforellen. Bei 0,5 ppm war eine signifikante Fluchtreaktion nach 45 min festzustellen, bei 5,0 ppm nach 20 min ($P < 0,05$). Die Schädigung der Tilapien war zu diesem Zeitpunkt schon soweit fortgeschritten, daß sich Mortalitätsraten bis zu 50 % ergaben. Die beiden subletal wirkenden Konzentrationen (0,05 und 0,1 ppm), bei denen die Eintrittszeit der Giftwirkung länger als die Versuchszeit war, hatten keinen Einfluß auf die Versuchsfische (Abb. 8).

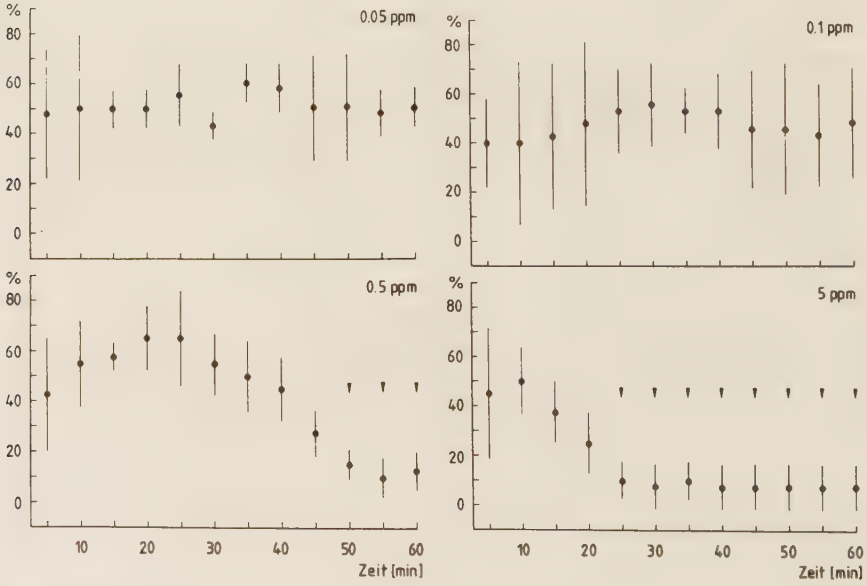


Abb. 8: Fluchtverhalten von Tilapien im zeitlichen Verlauf gegenüber 4 verschiedenen Aretit®-Konzentrationen. Auf der Ordinate ist der Anteil der Tiere in % aufgetragen, die sich zum angegebenen Zeitpunkt im Aretit®-haltigen Arm befanden. Die Pfeile (↓) geben ein signifikantes Fluchtverhalten an ($\chi^2 > 3,8$; $P < 0,05$).

VI. Diskussion

Screeningversuche

1. Beurteilung der Toxizität

Zur Beurteilung der relativen Empfindlichkeit der verschiedenen Arten gegenüber Aretit® wurden die Parameter Grenz-, Schwellen- und letaler Konzentrationsbereich, sowie LC_{50} und EC_{50}-Werte und die Eintrittszeiten der Giftwirkung herangezogen. Alle ermittelten Parameter sind zum Vergleich in Abb. 9 zusammengefaßt.

Das Herbizid Aretit® ist unter Zugrundelegung der ermittelten letalen Konzentrationsbereiche gegenüber allen Versuchstieren stark bis sehr hoch toxisch. Selbst die Vertreter der Mollusken und Anneliden reagieren auf das Herbizid noch empfindlich. Ihre sonst große Toleranz gegenüber Schadstoffen gibt es hier nicht.

Höchste Empfindlichkeit zeigen die Vertreter der Krebstiere, die wichtige Fischnährtiere darstellen. Bei ihnen treten Lähmungen schon im Bereich von 0,000025 ppm auf. Der 48 h LC_{50}-Wert liegt bei 0,05 ppm. Welche Bedeutung auch der Schwellenkonzentration für die Beurteilung der Toxizität zukommt, zeigt hier das gestörte Fortpflanzungsverhalten, das sich bereits bei einer Konzentration von 0,0005 ppm bemerkbar macht.
Vergleicht man die toxische Wirkung von Aretit® mit derjenigen von 23 Herbiziden aus den verschiedensten Stoffklassen (Sanders 1970), so ergibt sich, daß das Dinitrophenol in seiner Giftigkeit für Crustaceen von keiner anderen Substanz übertroffen wird. Selbst verschiedene chlorierte Kohlenwasserstoffe wirken hier weniger toxisch als Aretit®. Eine Ausnahme bildet (Lüdemann und Neumann

1960) lediglich Dieldrin® (0,1 ppm < LC_{100} ≦ 0,15 ppm). Der für Aretit® ermittelte LC_{100}-Bereich war hier gleich.

Unter den Insekten waren die Larven der Köcherfliegen - ihrem LC_{100}-Bereich entsprechend (0,3 ppm < LC_{100} ≦ 0,4 ppm) - drei bis viermal weniger empfindlich als die Krebschen. In den Versuchen mit sehr niedrigen Konzentrationen starben aber noch während der Nachbeobachtung im Verlauf von wenigen Tagen bis zu 30 % der Tiere an den Folgen der Vergiftung. Es ist möglich, daß hier Störungen im Verhalten (Verlassen der Köcher) eine Rolle spielen.

Röhrenwürmer - die allgemein als wenig empfindlich gegenüber Pestiziden, wie auch Schwermetallen gelten, erwiesen sich gegenüber Aretit® als etwa gleich empfindlich wie Schnecken. Ein Vergleich mit der Wirksamkeit von anderen Präparaten ergibt, daß die Würmer selbst gegenüber Substanzen aus der Gruppe der chlorierten Kohlenwasserstoffe weniger empfindlich sind als gegenüber dem Dinitrophenolderivat (Whitten und Goodnight 1966). Lüdemann und Kaiser konnten bereits 1966 an Tubifex einen 24 h LC_{100}-Bereich von ≦ 10 ppm Aretit® ermitteln, was annähernd den vorliegenden Ergebnissen entspricht. Auch Pravda (1973) konnte zeigen, daß Dinoseb (nicht acetylierter Wirkstoff von Aretit®) unter 14 verschiedenen Herbiziden die für die Tubificiden weitaus giftigste Substanz war. Ein Vergleich mit der Intoxikation durch Pentachlorphenol (Chapman et al. 1982), zeigt daß die Tiere auch anderen Phenolderivaten gegenüber eine sehr geringe Toleranz zeigen. Im 96 h Versuch lag der LC_{50}-Wert bei 0,38 mg/l. Der entsprechende Aretit®-Wert betrug 1,34 ppm.

Die in der Regel am Ende der Empfindlichkeitsskala stehenden Mollusken reagierten gegenüber Aretit® schon bei relativ niedrigen Konzentrationen. Während die Planorbiden bei Konzentrationen von 2 ppm starben, hatten die Lymnaeen schon bei 1,2 ppm keine Überlebenschancen mehr. Wiederum zeigt ein Vergleich mit der Wirksamkeit von 14 weiteren

Herbiziden an Lymnaea, daß Dinoseb von allen geprüften Substanzen die höchste Toxizität besitzt (Pravda 1973). Gegenüber Aretit® müssen also auch die Mollusken als empfindlich betrachtet werden. Die von Besch (1977) allgemein formulierte Aussage, wonach bei Erreichen der Mortalitätsgrenze für Pulmonaten durch einen Schadstoff die Toleranzgrenze für andere Süßwassertiere bereits überschritten ist, läßt sich jedoch auch bei Aretit® bestätigen.

Gegenüber allen untersuchten Fischarten erwies sich Aretit® als hoch bis sehr hoch toxisch. Die letalen Konzentrationsbereiche lagen stets < 1 ppm, die Schwellenbereiche zwischen 0,02 und 0,07 ppm.
Am empfindlichsten reagierten die Bachforellen mit einem 96 h LC_{50}-Wert von 0,06 ppm. Danach folgten die Äsche (0,08 ppm), der Karpfen (0,09 ppm) und schließlich die Regenbogenforelle (0,11 ppm; Abb. 9). Da die verschiedenen Arten in Alter und Größe differierten, ist eine Empfindlichkeitsreihung mit den vorliegenden Daten unzulänglich. Ein Vergleich der bereits vorliegenden Werte verschiedenaltriger Salmoniden zeigt jedoch, daß die 96 h LC_{50}-Werte sehr nahe beieinander liegen. Christie und Penney (1972) ermittelten bei Salmo gairdneri einen 96 h LC_{50}-Wert von 0,11 mg/l; Lipschuetz (1971) fand ebenfalls bei Salmo gairdneri nach 24 h entsprechend Werte zwischen 0,07 und 0,3 ppm, die je nach dem ph-Wert des Wassers schwankten.

Ein Vergleich der Toxizität über das gesamte Artenspektrum (Abb. 9) zeigt (mit Ausnahme der Krebschen) eine auffallend geringe Bandbreite (Bereich hoch bis sehr hoch giftig). Die graduellen Unterschiede sind hier viel geringer als in anderen Pestizidgruppen (Kulzer et al. 1983). Die besondere Wirkungsweise der Dinitrophenole ist möglicherweise die Ursache hierfür.

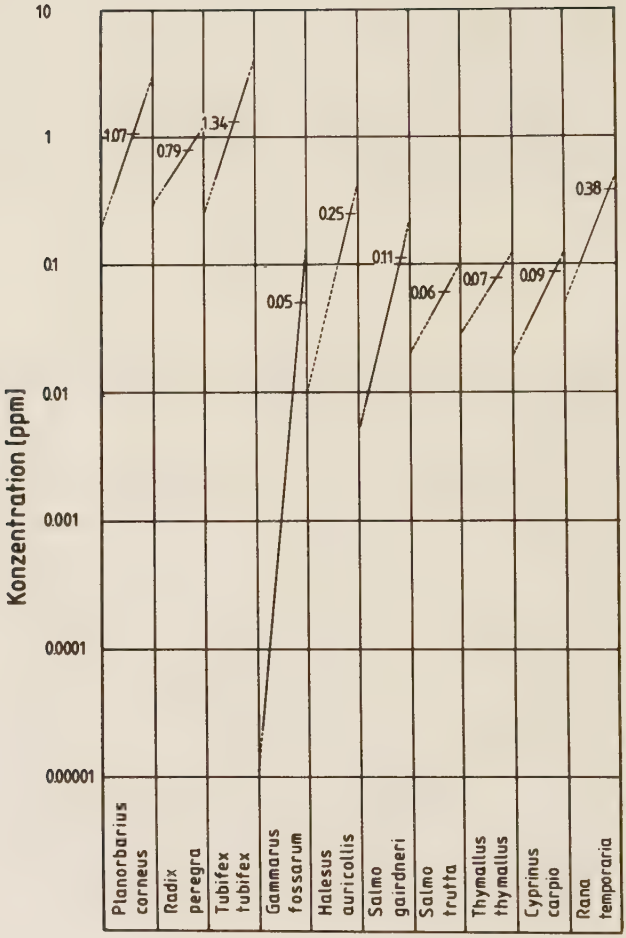


Abb. 9: Vergleich der für einheimische Süßwasserfische, Amphibien und Evertebraten ermittelten LC_{50}-Werte, Grenzkonzentrations- und letale Konzentrationsbereiche. Für jede Art (Abszisse) ist links unten der Bereich der Grenzkonzentration (gestrichelt) und rechts oben der Bereich der letalen Konzentration (gestrichelt) eingetragen. Die Bereiche sind durch eine Gerade miteinander verbunden. 96 h LC_{50}-Werte (Querstriche) sind aufgeführt (Ausnahme Gammarus; hier 48 h LC_{50}-Wert).

2. Manifestation der Vergiftung (Vergiftungsbild)

Die bisher vorliegenden Untersuchungen über die Wirkungsweise von Dinitrophenolderivaten haben gezeigt, daß diese in den Energiestoffwechsel eingreifen. Diese Störung wird vom Organismus mit einer Steigerung des Stoffwechsels beantwortet (Klimmer 1971, Wirth und Gloxhuber 1981). Auch aus den aufgezeichneten Vergiftungsbildern ergibt sich stets der Eindruck eines metabolisch wirksamen Giftstoffes. Die Symptomatologie der Vergiftung ist nachstehend für alle untersuchten Tierarten zusammengefaßt.

Gammarus: Allgemeine Erregung, fluchtartiges Schwimmen, Verlassen des Wassers, Koordinationsstörungen in den Bewegungen, Taumeln, Krämpfe, Immobilisierung, Einstellen des Pleopodenschlages, Tod.

Halesus: Allgemeine Erregung, Verlassen des Wassers, unkoordinierte Bewegungen, Rückzug in den Köcher oder Verlassen desselben, verzögerte Reaktion auf Berührung, Tod.

Planorbarius, Radix: Keine erkennbare Erregungsphase, Ausstoßen von Luft, Rückzug in das Gehäuse, Absinken oder Treiben im Wasser, verzögerte Reaktion auf Berührung, Immobilisierung, Tod.

Tubifex: Allgemeine Erregung, starke Bewegungsreaktion, Auflösen der gebildeten Knäuel, Schlängelbewegungen, Kontraktionen des gesamten Körpers, Verschleimung und Einrollung, Tod.

Fische: Unruhiges Verhalten, starke Erregung, Schwimmen knapp unter dem Wasserspiegel, bei Salmo Luftschnappen, Springen und Schüttelbewegungen des Vorderkörpers, Abspreizen der Kiemendeckel, s-förmige Krümmung des Rumpfes, Störung der normalen Körperlage, wiederholtes Aufstoßen zur Wasseroberfläche, Verharren in senkrechter Stellung, Rücken- oder Seitenlage, Tod.

Eine Ausnahme bilden lediglich die Karpfen. Im Vergleich zu den Salmoniden verläuft bei ihnen die Intoxikation "undramatischer". Unterschiedliche Vergiftungsbilder bei Forellen und Karpfen wurden von Danecker (1964) auch unter Ammoniakeinfluß beobachtet.

In nahezu allen Fällen entsteht die Reihenfolge:

Unruhiges Verhalten → Hyperaktivität → Ermüdung → Schädigung → Lähmung → Tod.

Bei Thymalliden und Salmoniden liegen die Todeszeiten stets innerhalb der ersten 24 h nach Versuchsbeginn. Zu einem späteren Zeitpunkt sterben keine Versuchsfische mehr ab (Abb. 10). Die mittlere, für jeweils 50 % der Versuchsfische

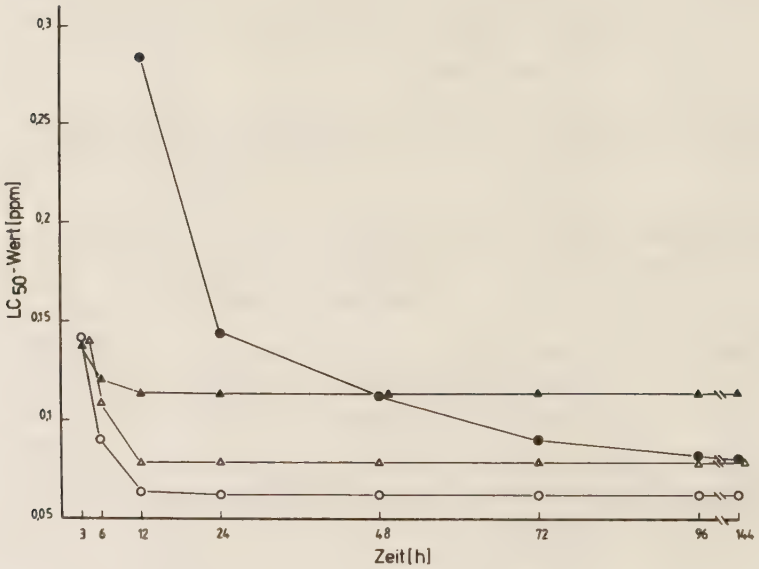


Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der 96 h LC_{50}-Werte bei Salmo gairdneri, Salmo trutta, Thymallus thymallus und Cyprinus carpio.

▲ *Salmo gairdneri,*
○ *Salmo trutta,*
△ *Thymallus thymallus,*
● *Cyprinus carpio.*

tödliche Konzentration bei beliebig langer Exposition auch als "letztendliche mittlere Toleranzgrenze" bezeichnet (Doudoroff et al. 1951) ist hier schon erreicht. Ähnliche Verhältnisse fand Woodward (1976) auch bei Vergiftung von Salmo clarki und Salvelinus namaycash mit Dinoseb.
Nur bei Karpfen treten Todesfälle auch bis zum Versuchsende auf; die "letztendliche mittlere Toleranzgrenze" ist nach 96+48 h Nachbeobachtung noch nicht erreicht. Dies wirkt sich auch auf die 96 h LC_{50}-Werte aus, die bei kurzer Einwirkungsdauer des Giftes (6-12 h) weitaus höher liegen als bei den anderen untersuchten Fischarten. Erst mit zunehmender Expositionszeit nähern sie sich den bei Salmo und Thymallus ermittelten Werten (Abb. 10). Die erhöhte Widerstandskraft geht vermutlich auf eine Stoffwechselreaktion zurück. Von Karpfen ist bekannt, daß sie unter O_2-Mangel verschiedene anaerobe Stoffwechselwege einschlagen (Driedzic und Hochachka 1975, Johnston 1975, Hochachka und Somero 1973). Möglicherweise können Karpfen auf diese Weise auch eine Stoffwechselstörung für einige Stunden tolerieren.

Auswirkungen auf einfache interspezifische Beziehungen innerhalb der Nahrungskette

Die Auswirkungen einer Gewässerkontamination mit Schadstoffen lassen sich bis jetzt vor allem durch die in Screeningversuchen ermittelten Daten, durch biologische Vergiftungsbilder, aber auch durch histopathologische Befunde abschätzen. Alle derartigen Untersuchungen erfolgen unter weitgehend standardisierten Bedingungen an Individuen einer Art. Die Ergebnisse sind reproduzierbar - aber nur mit Vorbehalt auf ein Ökosystem übertragbar (Besch 1982) -.
Untersuchungen auf der Ebene des gesamten Ökosystems sind

dagegen nicht kontrollierbar und auch nicht reproduzierbar. Den bestmöglichen Zugang zu dieser Ebene bieten bis jetzt die Testmethoden aus dem Bereich der Verhaltensphysiologie, wobei jeweils zwei Repräsentanten verschiedener Trophiestufen der Intoxikation unterzogen werden. Läßt sich dabei eine Reaktionsweise gegenüber einem Nährtier oder umgekehrt gegenüber dem Räuber standardisieren, so kann sie als Parameter der Intoxikation verwendet werden. Es kommt zu direkten und indirekten Auswirkungen einer Intoxikation (Hammons 1981).

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Nahrungsbeziehungen zwischen Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) und Krebschen (Gammarus fossarum) gewählt, um primäre und sekundäre Auswirkungen der Intoxikation mit Aretit® zu erfassen. Die Forellen wurden dazu in einem Dressurprogramm solange zum Fang ihrer Beute veranlaßt, bis die gesamte Fanghandlung (Fangzeit, Fangergebnis) standardisiert war. Durch die Bedeckung der Aquarienböden sollte schließlich eine möglichst große Annäherung an natürliche Bedingungen erzielt werden. Räuber und Beute wurden jeweils alternierend mit Aretit® behandelt.

Bei den Versuchen ohne Grundbedeckung waren die Krebschen den Forellen schutzlos ausgeliefert. Dementsprechend waren auch die Fangzeiten und die Fangergebnisse nach einer Dressurphase optimal. Die Behandlung der Fische mit Aretit® beeinflußte in jedem Fall ihre Fangleistungen: Die relativ hohe Konzentration von 0,1 ppm (Einwirkungsdauer 1 h) führte bis zu einer 20-fach verlängerten Fangzeit, zu einer erschwerten Aufnahme der Beutetiere und zu allgemeiner Unsicherheit beim Fang. Die Wirkung hielt nahezu 48 h an - eine direkte Schädigung der Räuber lag vor -.

Eine unterschiedlich lange dauernde Aretit®-Behandlung der Fische mit Konzentrationen, die einer subakuten Vergiftung gleichkommen (0,07 ppm), verursachte ebenfalls Veränderungen im Beutefangverhalten. Es fiel besonders auf,

daß hierbei die kurze Behandlungszeit von 6 h gegenüber der 12- und 24-stündigen Behandlung die größten Veränderungen im Verhalten der Fische erbrachte. Wiederum war die Fangzeit verlängert. Nach 48 h hatten sich bereits alle Versuchstiere wieder erholt. Die Giftwirkung war somit auch im Verhaltensexperiment nicht mehr meßbar.

Die nachhaltigsten Veränderungen in den Fangleistungen der Fische ergaben sich bei der Behandlung der Krebschen mit Aretit®. Die meist stark gelähmten Tiere wurden von den Fischen nur noch mit Verzögerung bemerkt. In diesem Falle fehlten die spezifischen, das Fangverhalten auslösenden Reize. Dadurch stieg die Fangzeit im Extremfall bis auf das 24-fache an. Die Aufnahme der vergifteten Nahrung hatte bei den Fischen aber keinen erkennbaren Einfluß oder nachteilige Folgen. Das Ergebnis zeigt neben der primären Schädigung der Krebschen auch die sekundären Auswirkungen bei den nicht geschädigten Räubern. Es entspricht somit den Erfahrungen von Hammons (1981), der ebenfalls die Verschlechterung der Fangleistung bei den Räubern auf untypisches Verhalten der vergifteten Beutetiere zurückführt.

Die unnatürliche Räuber-Beute-Situation in den Vollglasbecken wurde durch die Bodenbedeckung mit feinem Kies weitgehend beseitigt. Die Fische mußten nun die Krebschen in dem Kies suchen; nur freischwimmende Tiere konnten sie sofort fangen. Die Beutetiere hatten erstmals eine Chance zwischen den Steinchen zu entkommen. Dies gelang ihnen, solange sie sich (auch noch nach der Aretit®-Behandlung) in den Grund einwühlen konnten. Nach Intoxikation der Krebschen (0,03 ppm, 24 h) stieg auch hier die Fangzeit bis auf das 25-fache der vorausgehenden Kontrollmessungen an, und die Zahl der pro Zeiteinheit gefangenen Tiere sank drastisch. Die Ursache für den geringen Fangerfolg war - wiederum sekundär - das untypische Verhalten der Krebschen, die sich versteckten und nicht mehr an die Kiesoberfläche zurückkehrten.

Eine unterschiedlich lange Behandlungsdauer mit Aretit® kann die Aktivität der Krebschen aber auch umkehren und zu hektischem Verhalten führen. Dies zeigte sich bei einer Behandlung mit 0,08 ppm nach 1 h Einwirkungsdauer. Die Überaktivität der Gammariden war für den Beobachter noch kaum zu erkennen; die Fische aber wurden dadurch bereits zu einem schnelleren Fang veranlaßt. Die verkürzte Fangzeit bei Hyperaktivität (Erregungsphase), wie sie die Krebschen nur in der Anfangsphase der Behandlung zeigen, ist ebenfalls eine sekundäre Wirkung der Vergiftung. Sie konnte bereits in anderen Räuber-Beute-Verhältnissen und auch nach Vergiftung mit verschiedenen Substanzen nachgewiesen werden (Farr 1977, Schneider et al. 1980, Hatfield und Anderson 1972, Folmar et al. 1981, Hedtke und Noris 1980). Dabei ist zu berücksichtigen, daß sich bei Fischen, die als Beute vergiftet und anderen Fischen zum Fang angeboten werden, das biologische Vergiftungsbild im Vergleich zu den Krebschen in veränderter Weise zeigt.
In allen Versuchen, in denen die Forellen mit Aretit® behandelt wurden, verschlechterten sich die Fangergebnisse in den mit Kies bedeckten Versuchsbecken. Die erschwerten Fangbedingungen und möglicherweise auch eine verminderte Fangbereitschaft kommen als Ursache hierfür in Frage.

Schließlich konnte in einem Langzeitversuch gezeigt werden, daß auch eine mehrfache Verfütterung vergifteter Krebschen keine primäre Auswirkung und keinen erkennbaren Einfluß auf das Fangverhalten der Fische hat. Eine kumulierende Wirkung des Giftstoffes war zumindest nach diesem Zeitraum auszuschließen. Erst die anschließende Behandlung der Fische selbst veränderte die Fangleistung sofort nachhaltig.

Um die Versuchsbedingungen dem natürlichen Habitat soweit als möglich anzugleichen, wurde der Bodengrund auch noch bepflanzt und mit zusätzlichen Versteckmöglichkeiten ausgestattet. Hierbei zeigte sich, daß bereits eine extrem

niedrige Konzentration von Aretit® (0,00001 ppm), die das Verhalten der Gammariden noch nicht erkennbar beeinflußt, die Anzahl der im Versuch überlebenden Krebschen schon verändern kann.

Die in diesen Versuchen gewählten Parameter zeigen direkte und indirekte Auswirkungen einer Vergiftung; ihre Aussagekraft beschränkt sich aber auf die beiden beteiligten Partner. Schon die Anwesenheit einer dritten Art könnte andere Ergebnisse erbringen. Die Grenzen der Aussagen sind somit gesetzt; sie gehen aber klar über die in den Screening-Versuchen erfaßten Auswirkungen hinaus, denn die gewählten Verhaltensparameter sind weit empfindlicher gegenüber einer Intoxikation als die routinemäßig ermittelten Daten für die akute Toxizität.

Fluchtverhalten von Amphibienlarven und Fischen bei verschiedenen Aretit®-Konzentrationen

Die Überlebenschancen der Tiere in einem mit Schadstoffen belasteten Gewässer steigen, wenn diese Substanzen "erkannt" werden, und wenn die Möglichkeit zur Flucht gegeben ist. Verschiedene Salmoniden flüchten z.B. schon bei geringen Verunreinigungen mit Schwermetallsalzen aus ihrem Habitat (Sprague et al. 1965, Giattina et al. 1982). Auch aquatischen Herbiziden gegenüber sind Ausweichreaktionen bekannt (Folmar 1976). Im dritten Versuchsabschnitt wurde deshalb geprüft, ob und wie schnell verschiedene Aretit®-Konzentrationen "erkannt" werden. Als Versuchstiere dienten je eine Kalt- und Warmwasserart von wirtschaftlich wichtigen Fischen (MacCrimmon 1971, Staeck 1975), ferner Amphibienlarven, deren chemischer Sinn besonders gut ausgeprägt ist (Kopsch 1952). Die Versuchsanlage erlaubte auch eine statistische Bearbeitung der Ergebnisse.

1. Amphibienlarven (Rana temporaria): Die Versuche mit den Kaulquappen zeigten in keinem Fall - auch nicht bei hohen Konzentrationen (bis 10 ppm) - ein gezieltes Fluchtverhalten. Vergleichbare Untersuchungen mit anderen Pestiziden liegen bislang nicht vor. Da die Kaulquappen von Kröten über einen sehr ausgeprägten Geruchssinn verfügen (Kulzer 1959), mit dessen Hilfe sie noch sehr geringe Konzentrationen ihrer körpereigenen Schreckstoffe wahrnehmen und darauf auch mit Flucht reagieren, liegt der Schluß nahe, daß die Tiere im Versuch das Dinitrophenol nicht "erkennen" und entsprechend den Konzentrationen auch absterben.

2. Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) und Tilapien (Sarotherodon leucostictus): Beide Arten zeigten gegenüber subletalen Konzentrationen noch kein Fluchtverhalten. Dabei entsprach die niedrigste Testkonzentration (0,05 ppm) bereits 50 % des 96 h LC_{50}-Wertes. In diesem Konzentrationsbereich wird Aretit® demnach noch nicht bemerkt. Ähnliche Ergebnisse erzielten Sprague und Drury (1969) auch mit reinem Phenol, das bei Regenbogenforellen keine Ausweichreaktion in dem Konzentrationsbereich 0,00001-10 mg/l verursachte. Nach Summerfelt und Lewis (1967) waren sogar Konzentrationen bis zu 20 mg/l ohne entsprechende Wirkung. Elritzen (Phoxinus phoxinus) tolerierten bis zu 4 mg/l; höhere Konzentrationen führten bereits zu sichtbaren Vergiftungserscheinungen (Jones 1951). Zu gleichen Resultaten gelangten Stott und Buckley (1979). Auch bei ihnen zeigt sich, daß Phenol im Bereich subletaler Konzentration von den Fischen nicht bemerkt wird. Dies ist überraschend, da gerade Salmoniden schon sehr geringe Konzentrationen von Schwermetallen perzipieren. Nach Sprague (1968) schrecken sie bereits vor einer Zink-Konzentration von 5,6 µg/l (= 1/100 der letalen Konzentration) deutlich zurück; bei Kupfer lösten Konzentrationen von 0,1-6,4 µg/l Fluchtreaktionen aus (Folmar 1976, Sprague et al. 1965, Westlake et al. 1974, Giattina et al. 1982).

Beide Versuchsfischarten - Regenbogenforellen wie auch die Tilapien - reagierten auf das Einwirken letaler Aretit®-Konzentrationen mit Flucht. Betrachtet man dabei nur die Ergebnisse nach 1-stündiger Versuchsdauer, so ist die Reaktion bei beiden Arten auch statistisch signifikant. Die Fluchtreaktion trat jedoch erst nach einem von der Konzentration abhängigen Zeitraum auf, und zwar dann, wenn die Tiere soweit vergiftet waren, daß bereits sichtbare Schädigungen vorlagen (= Eintrittszeit der Giftwirkung). Wie aus den Untersuchungen zur akuten Toxizität bekannt ist, reagieren Tilapien und Salmoniden zu diesem Zeitpunkt mit höchster Erregung und schwimmen pausenlos im Aquarium umher. Die registrierte Fluchtreaktion kann somit auch als Ergebnis eines "körperlichen Unbehagens" oder einer Schädigung des Organismus verstanden werden.
Nach Verlassen des Giftschenkels in der Versuchsanordnung erfährt der Fisch im sauberen Wasser wieder eine körperliche Erholung. Das Fluchtverhalten wird hier also nur mittelbar durch körperliche Schädigung ausgelöst; die chemischen Sinnesorgane vermitteln dagegen noch keine Wahrnehmung.
Die Reaktion im Fischorganismus läuft individuell unterschiedlich schnell ab; manche der Fische flüchteten bereits zu einem Zeitpunkt, zu dem eine Wiedererholung im giftfreien Wasser noch möglich ist. Andere sind jedoch schon soweit geschädigt, daß sie im weiteren Verlauf auch im "sauberen" Wasser sterben; teilweise schwimmen sie sogar in den Giftschenkel zurück und verenden hier. Von einer gerichteten Fluchtreaktion kann man in diesem Stadium nicht sprechen.

Die Ursachen, warum bestimmte Stoffe im Wasser erkannt und dann gemieden werden, sind bis heute nicht bekannt. Mit Ausnahme der Schwermetalle, die in den meisten Fällen gemieden werden (Giattina und Garton 1983), gibt es keine chemische Stoffgruppe, auf die Fische einheitlich mit einer Fluchtreaktion antworten. Oftmals unterscheiden sich flucht-

auslösende und nicht -auslösende Substanzen chemisch nur sehr geringfügig voneinander (Folmar 1967, Hansen 1969, Hanson et al. 1973, 1974). Auch Konzentrationen, bei denen erstmalig Fluchtverhalten induziert werden kann, streuen beträchtlich. Sie zeigen keine Beziehung zu den jeweiligen LC_{50}-Werten (Giattina und Garton 1983).

Die bisher vorliegenden Untersuchungen über die Wirksamkeit von Phenolen und Phenolderivaten deuten darauf hin, daß diese Substanzen von Fischen, wie auch von Amphibienlarven, nicht direkt bemerkt werden. Dies gilt zumindest für den subletalen Konzentrationsbereich und ist bei Dosierung im letalen Bereich wahrscheinlich. Eine rasche "Alarmierung" der Tiere bei einer Gewässerbelastung, die noch eine rechtzeitige Flucht ermöglichen könnte, tritt nicht ein.
Die möglichen Folgen einer Aretit®-Intoxikation bei den Nicht-Ziel-Organismen eines natürlichen Gewässers lassen sich demnach in folgender Weise kennzeichnen:

a) Das gesamte Artenspektrum wird reduziert.

b) Überlebende Arten werden direkt oder indirekt geschädigt.

c) Es treten Störungen im Verhalten, insbesondere im Fortpflanzungsverhalten auf.

d) Die Nahrungsbeziehung verändert sich direkt und indirekt.

e) Die überlebenden Fische und Amphibien zeigen keine gezielte Ausweichreaktion im Bereich subletaler Konzentrationen.

Zu erwarten ist, daß sich sowohl die Nahrungsketten als auch die Qualität der Nahrung innerhalb der Biozönose verändern, zu deren Wiedererholung möglicherweise mehrere Jahre nötig sind. Aus diesem Grund ist von der Anwendung von Aretit® in unmittelbarer Gewässernähe, bzw. in dem Gewässer selbst, ganz abzuraten.

VII. Zusammenfassung

Die Empfindlichkeit verschiedener Süßwasserorganismen gegenüber Aretit® und die Auswirkungen einer möglichen Intoxikation auf zwischenartliche Nahrungsbeziehungen wurden untersucht. Ferner wurde geprüft, ob Aretit® im Wasser bei Amphibienlarven und Fischen eine Ausweichreaktion auslöst.

1. Die akute Toxizität (LC_{50}, 96 oder 48 h) von Aretit® wurde an folgenden Evertebraten und Vertebraten des Süßwasserökosystems ermittelt: Mollusca (Planorbarius corneus, Radix peregra), Annelida (Tubifex tubifex), Arthropoda (Gammarus fossarum, Halesus auricollis); Vertebrata (Salmo trutta, Salmo gairdneri, Thymallus thymallus, Cyprinus carpio und Rana temporaria Larven). Für jede untersuchte Art wurde das biologische Vergiftungsbild festgehalten. Als höchst empfindlich erwiesen sich die Arthropoda (Gammarus fossarum; 48 h LC_{50}-Wert 0,05 ppm), die größte Toleranz zeigten die Vertreter der Annelida (Tubifex tubifex) mit einem 96 h LC_{50}-Wert von 1,34 ppm. Bei den untersuchten Fischarten lag der 96 h LC_{50}-Wert zwischen 0,06 ppm (S. trutta) und 0,11 ppm (S. gairdneri).

2. In Dressurversuchen wurden die Auswirkungen einer Aretit®-Behandlung auf interspezifische Nahrungsbeziehungen (Räuber-Beute-Beziehung) untersucht. Als Räuber dienten Regenbogenforellen (S. gairdneri), als Beutetiere Bachflohkrebse (Gammarus fossarum). Unter definierten Versuchsbedingungen wurden die Fische zum Beutefang dressiert. Als Parameter dienten die Fangzeiten bzw. die Zahl der gefangenen Beutetiere pro Zeiteinheit. Die Umgebungsbedingungen wurden fortschreitend dem natürlichen Habitat angeglichen. Es zeigte

sich, daß in dem Beziehungsgefüge Fisch-Krebs eine Intoxikation der Fische in der Regel zu einer Verschlechterung der Fangergebnisse führt. Eine lange (≤ 24 h) subletale Einwirkung des Herbizides führte noch während der Behandlung zur Wiedererholung der Versuchsfische. Nach 36 h Aretit®-Behandlung lagen keine meßbaren Veränderungen mehr vor. Eine kurze oder lange Behandlungsdauer der Nährtiere führte - entsprechend den verschiedenen Vergiftungsbildern - zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die weitaus größten Veränderungen ergaben sich nach Intoxikation der Nährtiere, die ihr typisches, die Fangreaktion auslösendes Verhalten, nicht mehr zeigten. Die Versuche im simulierten Habitat zeigten schließlich, daß bereits geringste Konzentrationen von Aretit® (0,00001 ppm) einen meßbaren Einfluß auf das Verhalten der Beutetiere (Krebschen) haben. Die Versuchsmethode eignet sich somit zum Nachweis winziger Substanzmengen und übertrifft die Aussagen der konventionellen LC-Bestimmungen bei weitem.

3. Letale und subletale Aretit® -Konzentrationen verursachten bei Larven von Rana temporaria keine Fluchtreaktionen. Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) und Tilapien (Sarotherodon leucostictus) zeigten im subletalen Bereich ebenfalls kein Ausweichverhalten. Erst letale Konzentrationen lösten eindeutig Fluchtreaktionen aus, jedoch erst nach einer bereits äußerlich erkennbaren Schädigung der Fische. Die Fluchtreaktion wird vermutlich mittelbar durch Schädigung der Fische ausgelöst und nicht über die direkte Wahrnehmung durch Sinnesorgane (Geruch oder Geschmack).

VIII. Literatur

Alabaster, J.S. und Lloyd, R. (1980): Water quality criteria for freshwater fish. London, Boston, Sydney, Wellington, Durban, Toronto.

Ashton, F.M. und Crafts, A.S. (1973): Mode of action of herbicides. New York.

Besch, W. (1977): Studien zum Gewässerschutz. 2. Bioteste in der limnischen Toxikologie. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Institut für Wasser und Abwasserwirtschaft Karlsruhe. Karlsruhe.

- - - - - (1982): Kritische Bewertung der Rolle von toxikologischen Tests bei der Gewässerüberwachung. Decheniana - Beihefte 26, 67 - 77.

Beyer, W.H. (1968): Handbook for probability and statistics. Cleveland.

Brown, A.W.A. (1978): Ecology of pesticides. New York, Chichester, Brisbane, Toronto.

Buikema, A.L., McGinnis, M.J., Cairns, J. (1979): Phenolics in the aquatic ecosystem: a selected review of recent literature. Marine Environ. Res. 2, 87 - 181.

Chapman, P.M., Farrell, M.A., Brinkhurst, R.O. (1982): Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47 - 67.

Christie, P.M.P. und Penney, G.H. (1972): Preliminary results of bioassays to determine the toxicity of some agricultural pesticides used in the maritime area. Environ. Can. Res. Develop. Br., Ms Rep. 72-2. Halifax.

Cremlyn, R. (1978): Pesticides: preparation and mode of action. Chichester, New York, Brisbane, Toronto.

Danecker, E. (1964): Die Jauchevergiftung von Fischen - eine Ammoniakvergiftung. Österreichs Fischerei 1964, 55 - 68.

Doudoroff, P., Anderson, B.G., Burdick, G.E., Galtsoff, P.S., Hart, W.B., Patrick, R., Strong, E.R., Surber, E.W., van Horn, W.M. (1951): Bio-assay-methods for the evaluation of acute toxicity of industrial wastes to fish. Sewage and Ind. Wastes 23, 1380 - 1397.

Driedzic, W.R. und Hochachka, P.W. (1975): The unanswered question of high anaerobic capabilities of carp white muscle. Can. J. Zool. 53, 706 - 712.

Farr, J.A. (1977): Impairment of antipredator behavior in Palaemonetes pugio by exposure to sublethal doses of parathion. Trans. Am. Fish. Soc. 106, 287 - 290.

Folmar, L.C. (1976): Overt avoidance reaction of rainbow trout fry to nine herbicides. Bull. Env. Cont. and Tox. 15, 509 - 514.

Folmar, L.C., Craddock, D.R., Blackwell, J.W., Joyce, G., Hodgins, H.d. (1981): Effects of petroleum exposure and predatory behavior of coho salmon (Oncorhynchus kisutch). Bull. Env. Cont. and Tox. 27, 458 - 462.

Giattina, J.D., Garton, R.R., Stevens, D.G. (1982): Avoidance of copper and nickel by rainbow trout as monitored by a computer-based data acquisition system. Trans. Am. Fish. Soc. 111, 491 - 504.

Giattina, J.D. und Garton, R.R. (1983): A review of the preference-avoidance responses of fishes to aquatic contaminants. Residue Reviews 87, 43 - 90.

Goodyear, C.P. (1972): A simple technique for detecting effects of toxicants or other stresses on a predator-prey interaction. Trans. Am. Fish. Soc. 101, 367 - 370.

Hammons, A.S. (1981): Methods for ecological toxicology. A critical review of laboratory multispecies tests. Ann Arbor.

Hansen, D.J. (1969): Avoidance of pesticides by untrained sheepshead minnows. Trans. Am. Fish. Soc. 98, 426 - 429.

Hansen, D.J., Schimmel, S.C., Keltner, J.M. Jr. (1973): Avoidance of pesticides by grass shrimp (Palaemonetes pugio). Bull. Env. Cont. and Tox. 9, 129 - 133.

Hansen, D.J., Schimmel, S.C., Matthews, E. (1974): Avoidance of aroclor 1254 by shrimp and fishes. Bull. Env. Cont. and Tox. 12, 253 - 256.

Hart, C.W. und Fuller, S.L.H. (1974): Pollution ecology of freshwater invertebrates. New York. London.

Hassall, K.A. (1982): The chemistry of pesticides. Weinheim, Deerfield Beach, Basel 1982.

Hatfield, C.T. und Anderson, J.M. (1972): Effects of two insecticides on the vulnerability of atlantic salmon (Salmo salar) parr to brook trout (Salvelinus fontinalis) predation. J. Fish. Res. Bd. Canada 29, 27 - 29.

Hedtke, J.L. und Norris, L.A. (1980): Effect of ammonium chloride on predator consumption rates of brook trout (Salvelinus fontinalis) on juvenile chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha) in laboratory streams. Bull. Env. Cont. and Tox. 24, 81 - 89.

Hileman, B. (1982): Herbicides in agriculture. Environ. Sci. Technol. 16, 645 - 650.

Hochachka, P.W. und Somero, G.N. (1973): Strategies of biochemical adaptation. Philadelphia.

Iman, R.L. (1982): Graphs of use with the Lilliefors test for normal and exponential distribution. The Am. Statistician 36, 109 - 112.

Johnson, D.W. (1968): Pesticides and fishes - A review of selected literature. Trans. Am. Fish. Soc. 97, 398 - 422.

Johnston, I.A. (1975): Anaerobic metabolism in the carp (Carassius carassius L.). Comp. Biochem. Physiol. 51 B, 235 - 241.

Jones, J.R.E. (1951): The reactions of the minnow Phoxinus phoxinus (1.) to solutions of phenol, ortho-cresol, and para-cresol. J. Exp. Biol. 28, 261 - 274.

Kinne, O. (1954): Ökologie, Fortpflanzung, Biologie und Physiologie von Gammarus duebenii. Zeitschrift f. wiss. Zool. Abt. A, 327 - 491.

Klimmer, O. (1971): Pflanzenschutz und Schädlingsbekämpfungsmittel. Abriß einer Toxikologie und Therapie von Vergiftungen. Bonn.

Kopsch, F. (1952): Die Entwicklung des braunen Grasfrosches, Rana fusca. Stuttgart.

Kulzer, E. (1959): Neuere Untersuchungen über Schreck- und Warnstoffe im Tierreich. Naturwissenschaftl. Rundschau 8, 296 - 302.

Kulzer, E., Keller, T., Kimmich, F., Kling, D. (1983): Untersuchungen über die toxischen Nebenwirkungen der Pflanzenbehandlungsmittel Decis® (Pyrethroid - Insektizid) und Aretit® (Dinitrophenol - Herbizid) bei Tieren des Süßwasserökosystems (nicht veröffentlicht). Tübingen.

Lipschuetz, M. (1961): Toxicity of 2-secondary-butyl-4-6-dinitrophenol to blacknose dace and rainbow trout. New York fish and game journal 8, 110 - 121.

Lüdemann, D. und Neumann, H. (1960): Versuche über die akute toxische Wirkung neuzeitlicher Kontaktinsektizide auf Süßwassertiere (2. Beitrag). Z. angew. Zool. 47, 303 - 321.

Lüdemann, D. und Kayser, H. (1966): Beiträge zur Toxizität von Herbiziden auf die Lebensgemeinschaft der Gewässer. Teil II: Fischnährtiere. Gas- und Wasserfach 107, 256 - 260.

MacCrimmon, H.R. (1971): World distribution of rainbow trout (Salmo gairdneri). J. Fish. Res. Bd. Canada 28, 663 - 704.

Menzie, C.M. (1972): Effects of pesticides on fish and wildlife. In: Environmental toxicology of pesticides (F. Matsumura, G.M. Boush and T. Misato, eds.). New York.

Muirhead Thompson, R.C. (1971): Pesticides and freshwater fauna. New York.

Pickering, A.H., Hunt, E.P., Phipps, G.L., Roush, T.H., Smith, W.E., Spehar, D.L., Stephan, C.E., Tanner, D.K. (1983): Effects of pollution on freshwater fish and amphibians. Journal WPCF 55, 840 - 862.

Piementel, D. (1971): Ecological effects of pesticides on non- target species. Washington, D.C.: U.S. Govt. Printing Office.

Pravda, O. (1973): Über den Einfluß der Herbizide auf einige Süßwassertiere. Hydrobiologica 42, 97 - 142.

Ridgman, W. (1981): Experiment und Statistik in der Biologie. Stuttgart, New York.

Sachs, L. (1979): Angewandte Statisitk. Berlin Heidelberg, New York.

Sanders, H.O. (1970): Toxicities of some herbicides to six species of freshwater crustaceans. Journal WPCF 42, 1544 - 1550.

Schneider, M.J., Barraclough, S.A., Genoway, R.G., Wolford, M.L. (1980): Effects of phenol on predation of juvenile rainbow trout Salmo gairdneri. Environ. Poll. Ser. A 23, 121 - 130.

Schulz, D. (1981): Die Grundlagen des toxikologischen Fischtestes. Fisch und Umwelt 10, 49 - 50.

Schweiger, G. (1956): Die toxische Einwirkung von Schwermetallsalzen auf Fische und Fischnährtiere. Dissertation München.

Spehar, R.L., Carlson, R.W., Lemke, A.E., Mount, D.I., Pickering, Q.H., Snarski, V.M. (1980): Effects of pollution on feshwater fish. Journal WPCF 52, 1703 - 1768.

Sprague, J.B. (1968): Avoidance reactions of rainbow trout to zinc sulphate solutions. Water Research 2, 367 - 372.

Sprague, J.B., Elson, P.F., Saunders, R.L. (1965): Sublethal copper-zinc pollution in a salmon river - A field and laboratory study. Internat. J. Air Water Poll. 9, 531 - 543.

Sprague, J.B. und Drury, D.E. (1969): Avoidance reactions of salmonid fishes to representative pollutants. In: Advances in water pollution research (S.H. Jenskins ed.). New York.

Staeck, W. (1975): Cichliden - Verbreitung, Verhalten, Arten. Wuppertal - Eberfeld.

Stott, B. und Buckley, B.R. (1979): Avoidance experiments with homing shoals of minnows, Phoxinus phoxinus in a laboratory stream channel. J. Fish Biol. 14, 135 - 146.

Summerfelt, R.C. und Lewis, W.M. (1967): Repulsion of green sunfish by certain chemicals. J. Water Pollut. Control Fed. 39, 2030 - 2038.

Westlake, G.F., Kleerekoper, H., Matis, J. (1974): The locomotor response of goldfish to a steep gradient of copper ions. Water Resources Res. 10, 103 - 105.

Whitten, B.K. und Goodnight, C.J. (1966): Toxicity of some common insecticides to tubificids. J. Water Pollut. Control Fed. 38, 227.

Wirth, W. und Gloxhuber, C. (1981): Toxikologie. Stuttgart.

Woodward, D.F. (1976): Toxicity of the herbicides dinoseb and picloram to cutthroat (Salmo clarki) and lake trout (Salvelinus namaycush). J. Fish. Res. Bd. Canada 33, 1671 - 1676.

Teil II

Pathologische Veränderungen im Blutbild und in den Atmungsorganen von Salmo gairdneri R. nach akuter und subakuter Intoxikation mit Aretit®

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Summary	1
II.	Einleitung	4
III.	Material und Methoden	6
	1. Blutuntersuchungen	6
	2. Histopathologische Untersuchungen an Leber und Kiemen	8
IV.	Ergebnisse	9
	A. Hämatologische Untersuchungen	9
	1. Akute Intoxikation	9
	2. Subakute Intoxikation	16
	3. Veränderungen im Lebergewebe nach letaler und subletaler Aretit®-Einwirkung	23
	B. Histopathologie der Kiemen	28
	1. Lichtmikroskopische Untersuchungen nach akuter Intoxikation	28
	2. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen nach subakuter Intoxikation	32
V.	Diskussion	47
VI.	Zusammenfassung	57
VII.	Literatur	60

I. Summary

In different organs and tissues of the rainbow trout (Salmo gairdneri) the manifestation of a lethal (0.2 ppm) and a sublethal (0.07 ppm) exposure to Aretit® was examined. The blood parameters red blood cells, hemoglobin, hematocrit, blood glucose, methemoglobin, serum hemoglobin and ATP-content were measured at the lethal level of the toxic substance. Additionally, at the lower concentration the blood characteristics fragility of the erythrocytes and lactate level of the blood were determined.

1. In the blood of rainbow trouts, treated with acute toxic herbicide solution (0.2 ppm), the levels of the blood components hemoglobin, hematocrit and methemoglobin increased significantly only 1 h after the start of treatment, the ATP-content diminished. After 2 and 3 h all the examined blood parameters were significantly different from the control fish values. The level of hemoglobin had risen after 3 h intoxication to 40 %, the hematocrit to 35 % and the red blood cell content to 65 %. The greatest changes were observed in the methemoglobin (increase by a factor of 13) and the serum hemoglobin (increase by a factor of 10.5). Exposure to 0.07 ppm Aretit® for 48 h produced changes in all blood characteristics related to the duration of the treatment. All the determined blood factors were (except for the red cell content after 4 h and the blood glucose after 10 h) significantly changed after 4 and 10 h exposure. 14 h later the maximum effect of intoxication had already declined. After completion of the experiment (48 h) significant changes were no longer observed, except for the serum hemoglobin. The disappearance of initial blood changes following extended exposure strongly suggests, that a

regeneration takes place during the stay in the toxic solution.

2. In a histological examination of the Aretit®-treated fishes it was found that the sinusoids and the blood vessels contained less blood. As a result of lethal concentration all fishes demonstrated these alterations of blood content. A sublethal treatment had-comparable to the examined blood values - only a temporary effect. Additionally after 24 and 48 h Aretit®-induced cellular changes were found. These histopathological cell lesions were a hypertrophy and vacuolation of the liver parenchyma. Also present were degenerative changes characterized by karyolysis and focal necrosis. In some areas acidophilic cells were observed.

3. The histopathological effects of a lethal concentration (0.2 ppm) on the gills of the rainbow trout, primarily were a local hypertrophy of the epithelium of the gill lamellae. After a 2 h exposure the first subepithelial "lymph" spaces in the gill lamellae and filaments could be detected. Occasionally necrotic cells were identified. The action of a sublethal Aretit®-concentration was time-related. The lesions found after 4 h exposure were similar to those observed after a 1-2 h stay in the lethal concentration. Moreover a hyperemia in the central vein sinus was found. After 10 h the first haematomas appeared and hypertrophy and hyperplasia, especially of the gill lamellae epithelium, was observed. Occasionally severe hyperplasia resulted in fusion of the secondary lamellae and some detachment of the epithelium for both filaments and secondary lamellae. After 48 and 72 h treatment the histopathological changes had disappeared. The toxic actions could be identified more exactly by electron microscopic observations. The marked hypertrophy and formation of subepithelial "lymph" spaces was a result of

intercellular vacuolation. In severely affected parts of the gills, the secondary lamellae were surrounded by a mass of undifferentiated cells varying in size, shape and electron density of the cells. The majority of structural changes found in this study were of a nonspecific nature and therefore of limited diagnostic value. The physiological and biochemical alterations in the blood of Salmo gairdneri measured, may be a more sensitive tool in identifying an Aretit®-intoxication.

II. Einleitung

Zur allgemeinen Beurteilung der schädigenden Auswirkungen von Bioziden auf die Tierwelt des Süßwasserökosystems sind drei Wege einzuschlagen:

1. Es sind die wichtigsten Möglichkeiten zur Diagnose der Intoxikation zu prüfen. In vielen Fällen liefern dazu die biologischen Vergiftungsbilder erste Hinweise.

2. Es müssen soweit als möglich die Wirkorte der Substanz gefunden werden. Dazu bieten sich bei den Süßwassertieren, insbesondere bei den Fischen, das Blut, die Kiemen und das Lebergewebe zur Untersuchung an.

3. Der Wirkungsmechanismus ist aufzuklären. Erste Hinweise dafür liefern in der Regel die histopathologischen Veränderungen in den untersuchten Geweben und wiederum die biologischen Vergiftungsbilder.

Über Dinosebacetat, den Wirkstoff von Aretit®, liegen bisher keine derartigen Untersuchungen an Fischen vor, wohl dagegen für andere phenolische Substanzen (Zusammenfassung bei Buikema et al. 1979). Die toxische Wirkung dieser Stoffe beruht danach auf einem hemmenden Eingriff in den Energiestoffwechsel (Hassall 1982).

Da das Blut in der Regel auf Veränderungen des Gesamtzustandes eines Fisches besonders rasch reagiert, wurden in der vorliegenden Untersuchung einige Blutparameter bei akuter und subakuter Intoxikation geprüft. Leber und Kiemen, in denen kurzfristige histologische Veränderungen zu erwarten waren, wurden ebenfalls zur Untersuchung herangezogen.

Da die biologischen Vergiftungsbilder bei Fischen auch Störungen der Atmungsfunktion erkennen ließen, wurden schließlich weitere, für den Energiestoffwechsel bedeutsame Stoffe im Blut (Lactat-, ATP- und Methämoglobingehalt) zu verschiedenen Zeitpunkten der Intoxikation untersucht.

III. Material und Methoden

Für die hämatologischen und histologischen Untersuchungen standen Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) mit einer Gesamtlänge von 20,7 ± 4,0 cm und einem Gesamtgewicht von 76,6 ± 37,0 g zur Verfügung. Vor Versuchsbeginn wurden sie mindestens 10 Tage in 500 l Eternittrögen im Durchfluß bei 14 ± 1° C gehalten (LD 12:12 h) und täglich mit Forellenpellets (Raiffeisen) gefüttert.

Die Versuche wurden nach der Methode des statischen Tests mit einmaliger Substanzzugabe (Sprague 1969) in Vollglasbecken (30x22x24,5 cm), die mit 10 l abgestandenem, über Pasteurpipetten gut durchlüftetem Tübinger Leitungswasser gefüllt waren, durchgeführt. Das Herbizid Aretit® wurde hierbei in handelsüblicher Formulierung (Wirkstoff: Dinoseb-Acetat; chemische Bezeichnung: 2-(-1-Methylpropyl)-4,6-dinitrophenol-acetat; Wirkstoffmenge: 492 g/l) verwendet. Zu Beginn und am Ende der Versuche wurden jeweils folgende Wasserparameter ermittelt: Wassertemperatur 10,0° C; O_2-Gehalt 8,4-9,2 mg/l; ph-Wert: 7,4-8,0; Härte 10-12° dH. Jedes Becken war nur mit einem Fisch besetzt. Um die Tiere vor optischen Reizen zu schützen, waren die Aquarien auf allen Seiten mit brauner Pappe eingefaßt. 48 h vor Versuchsbeginn wurde zum letzten Mal gefüttert (Doudoroff et al. 1951). Die Eingewöhnugszeit an die Versuchsbedingungen betrug 24 h. Nach der jeweiligen Einwirkungszeit der Substanz wurden die Fische gefangen und in einer 2 %igen Urethanlösung narkotisiert. Für jede geprüfte Einwirkungsdauer wurden im akuten wie auch im subakuten Toxizitätstest mindestens 4 Fische untersucht. Gleichzeitig dienten mindestens 3 Fische als Kontrolle. Zur Untersuchung eines jeden Blutparameters wurden stets Forellen von gleichem Alter und vom gleichen Züchter verwendet. Bei Konzentrationen von 0,2 ppm (akuter Test) und bei 0,07 ppm (subakuter Test) wurden alle Parameter jeweils in 4 Versuchsreihen ermittelt.

1. Blutuntersuchungen

Das Blut wurde sofort nach Eintritt der Narkose durch Herzpunktion (Plastikspritze mit Ammoniumheparin, Kanülendurchmesser 0,8 mm) in 30-60 sec entnommen. Die zwei ersten Blutstropfen wurden verworfen. Den Versuchsfischen wurde nie mehr als 1 ml Vollblut entnommen (Hille und v. Pöllnitz 1980). Die Bestimmung der Blutparameter erfolgte unmittelbar auf die Entnahme und stets in derselben Reihenfolge:

Hämoglobingehalt: Die Messung erfolgte mit einer Biochemica-Testkombination (Nr. 124792, Fa. Boehringer) nach der Hämoglobincyanid-Methode (546 nm).

Hämatokrit: Die Messung erfolgte mittels Hämatokritröhrchen als Mikrobestimmung nach 15-minütiger Zentrifugation mit 1000 g (Snieszko 1960).

Erythrozyten: Die Auszählung der roten Blutkörperchen erfolgte mit Zählkammern von Zeiss-Thoma. Das Fischblut wurde zuerst in eine Blutmischpipette bis zur Marke 0,5 aufgezogen und dann mit Hendricks' Lösung (Hendricks 1952) bis zur Marke 101 verdünnt (1:200). Hayem'sche Lösung wurde nicht verwendet, da sich die Blutzellen von Fischen darin verändern (Hesser 1960). Ausgezählt wurden jeweils 80 weit auseinander liegende Kleinstquadrate (Begemann 1977). Pro Fisch wurden zwei Proben ausgewertet und gemittelt.

Glucose: Die Bestimmung erfolgte nach der O-Toluidin-Methode mit einem Merckotest (Nr. 3306, Fa. Merck), die photometrische Auswertung bei 578 nm.

Methämoglobin: Die Mikrobestimmung wurde nach Evelin und Malloy (1938) durchgeführt. Die Messung erfolgte als 5-minütige Differenzmessung bei 635 nm.

Lactat-Gehalt im Blut: Die Bestimmung erfolgte mit einer Diagnostica Test-Combination (Nr. 124842, Fa. Boehringer) mit 0,2 ml Vollblut. Sie wurde als Halbmikrobestimmung ausgeführt.

ATP-Gehalt im Blut: Die Messung wurde als Mikrobestimmung mit der Diagnostica Test-Combination Nr. 123897 (Fa. Boehringer) mit jeweils 0,2 ml Vollblut ausgeführt. Die photometrische Differenzmessung erfolgte bei 365 nm.

Osmotische Resistenz der Erythrozyten: Zur Bestimmung von Minimal- und Maximalresistenz der Erythrozyten wurden Reagenzgläschen mit je 5 ml NaCl-Lösung von 0,7 bis 0,2 % beschickt. Die Konzentrationsdifferenz zwischen den einzelnen Röhrchen betrug 0,05 % (Kaboth und Begemann 1977). In jedes Gläschen wurde ein Tropfen frisches Blut gegeben. Nach kräftigem Schütteln wurden die Röhrchen 3-4 h stehengelassen und danach die osmotische Resistenz ermittelt.

Hämoglobingehalt im Serum: Ein relatives Maß für den Grad der Hämolyse ist der Hämoglobingehalt im Serum. Nach der Methode von Zeitoun (1977) wurde dazu Vollblut 15 min lang zentrifugiert und anschließend der Hämoglobingehalt bestimmt.

Die Hämoglobin-, Glucose- und Lactatbestimmungen erfolgten an einem Eppendorf Filterphotometer (1101 M); der Methämoglobin- und ATP-Gehalt wurde mit einem Spektralphotometer der Fa. Beckmann (25) gemessen.

Statistische Auswertung der Blutuntersuchungen: Die bei unterschiedlich langer Einwirkung der Substanz ermittelten Blutparameter der Kontrollfische (akuter Test: nach 1, 2, 3, 3,5 h; subakuter Test: nach 4, 10, 24, 48 h) wurden primär auf Homogenität geprüft. Hierzu wurden die Varianzen der Ergebnisse (von jedem Zeitpunkt lagen mindestens 3 oder mehr Werte vor) mit Hilfe von Cochran's Test (Beyer 1968) miteinander verglichen. Ergab sich kein signifikanter Unterschied, konnte von einer homogenen Grundgesamtheit ausgegangen werden.

Alle ermittelten Kontrollwerte wurden dann zusammengefaßt und ergaben einen, durch entsprechend hohe n-Zahl exakten Mittelwert, der nun als Vergleichswert diente.
Die Blutparameter vergifteter und unvergifteter Fische wurden mit Hilfe des Kolmogoroff-Smirnov-Omnibus-Testes (KSO-Test) auf signifikante Unterschiedlichkeit geprüft. Dieser Test eignet sich, weil er auf Verteilungsunterschiede zwischen zwei unabhängigen Stichproben anspricht und keine Normalverteilung der Daten voraussetzt. Eine a priori Annahme der Normalverteilung bei Blutwerten erscheint generell problematisch (Reed et al. 1971), bei Fischen sogar besonders kritisch (Miller et al. 1983). Die bei Vergiftung zu den einzelnen Zeitpunkten berechneten Mittelwerte wurden ebenfalls miteinander verglichen. Hierzu wurde der Multiple Vergleich von Mittelwerten nach Scheffé herangezogen (Scheffé 1953, Sachs 1979). Wird im Vergleich zweier Mittelwerte eine kritische Differenz D überschritten, so wird die Nullhypothese, wonach beide Mittelwerte derselben Grundgesamtheit angehören, verworfen. Es können alle möglichen Kontraste in Betracht gezogen werden (Weber 1972).

2. Histopathologische Untersuchungen an Leber und Kiemen

Parallel zu den Blutuntersuchungen wurde auch das Leber- und Kiemengewebe der Versuchsfische histologisch aufgearbeitet. In keinem Falle wurden dabei Fische verwendet, die schon vorher zu Blutuntersuchungen gedient hatten, da die Autolyse im Bereich der Kiemen bereits unmittelbar nach dem Tod einsetzt. Bei akuter Vergiftung wurden die Fische 1 h (n=6), 2 h (6), 3 h (8) und 3,5 h (6) der Konzentration 0,2 ppm ausgesetzt, bei subakuter Intoxikation 4 h (6), 10 h (8), 24 h (6), 48 h (8) und 72 h (4). Nach verschieden langen Einwirkungszeiten wurde den Fischen sofort nach der Narkose die zweite und dritte Kieme jeder Körperseite, sowie die Leber herauspräpariert, in physiologischer Kochsalzlösung (0,56 % NaCl-Lösung) gespült und in Bouinscher Flüssigkeit fixiert. Zur Einbettung diente Paraplast. Die histologischen Schnitte (7-9 µm) wurden mit Hämalaun-Eosin bzw. Eisenhämatoxylin (nach Weigert) und Eosin gefärbt.

Von Fischen, die 24 h einer Aretit®-Konzentration von 0,07 ppm ausgesetzt waren, wurden die Kiemen auch elektronenmikroskopisch untersucht. Kleine Teile der Primärlamellen wurden dazu in 0,56 %iger NaCl-Lösung aufgefangen und sofort in 2,5 %igem Glutaraldehyd mit 2 %igem Cacodylatpuffer (ph 7,3) fixiert. Die Nachfixierung erfolgte in 2 %igem Osmiumtetroxid mit 0,1 M Phosphatpuffer (ph 7,2). Eingebettet wurde in Epon. Die Ultradünnschnitte (30-50 nm) wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt und am Siemens-Elmiskop 102 untersucht.

IV. Ergebnisse

A. Hämatologische Untersuchungen

1. Akute Intoxikation

Der bei den Kontrollen ermittelte durchschnittliche Hämoglobingehalt betrug 6,5 g/100 ml. Er erhöhte sich während der Intoxikation im Verlaufe von 3 h um 40 %. In ähnlichem Maße stieg auch der Hämatokrit nach 3 h an (Abb. 1). Hämoglobingehalt und Hämatokrit stiegen unter Aretit®-Einwirkung zu jedem geprüften Zeitpunkt gegenüber den Kontrollen signifikant an (Tab. 3). Der Multiple Vergleich der drei Mittelwerte während der Einwirkung der Substanz zeigte dagegen in keinem Fall eine signifikante Veränderung (Tab. 2). Die Gesamtzahl der Erythrozyten veränderte sich von 0,9 Mio/mm^3 (Kontrollwert) auf 1,13 Mio/mm^3 (nach 1 h) bzw. 1,49 Mio mm^3 (nach 3 h). Damit erhöhten sich die Ausgangswerte bis zur letzten Messung durchschnittlich um 65 % (Abb. 1). Die unmittelbar benachbarten Mittelwerte der Erythrozytengesamtzahl waren während der Herbizideinwirkung in keinem Fall signifikant voneinander verschieden, wohl jedoch die 2 und 3 h-Werte von den Kontrollen (Tab. 2, 3).

Das errechnete Erythrozyteneinzelvolumen sank im Verlauf der Intoxikation von $344{,}7 \times 10^{-14}$ l/Zelle (Kontrolle) auf $279{,}3 \times 10^{-15}$ l/Zelle ab; dies entspricht einer durchschnittlichen Verringerung von 20 %. Gleichzeitig erniedrigte sich der errechnete Hämoglobingehalt des Einzelerythrozyten um rund 15 % von $72{,}62 \times 10^{-12}$ g/Zelle auf $61{,}40 \times 10^{-12}$ g/Zelle (Tab. 1). Der errechnete durchschnittliche Hämoglobingehalt von 100 ml Blutzellen änderte sich dagegen nur unbedeutend; nach 3 h Einwirkungszeit lag er im Mittel unverändert vor. Die Verringerung von Volumen und Hämoglobin-

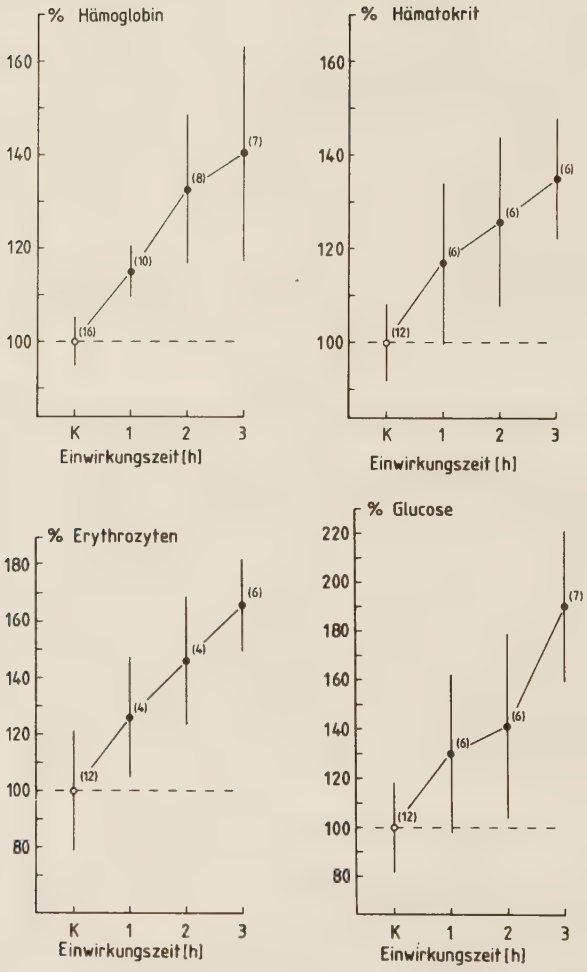


Abb. 1: Mittelwerte und Standardabweichungen der Blutparameter Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten und Glucose nach unterschiedlich langer Einwirkungszeit (0,2 ppm). Die Angaben erfolgen in Prozent und sind auf Kontrollwerte bezogen (K = Kontrollwert = 100 %); () = Zahl der Versuchstiere.

Tab. 1: Durchschnittswerte errechneter Blutparameter nach unterschiedlicher Einwirkungszeit von 0,2 ppm Aretit®. Die Angaben erfolgen absolut und in Prozent (Kontrollwert = 100 %).

Blutparameter	Kontrolle		1 h		2 h		3 h	
	%	absolut	%	absolut	%	absolut	%	absolut
Erythrozyteneinzelvolumen (10^{-15} l/Zelle)	100	344,70	92,7	319,55	87,2	300,46	81,0	279,26
Hämoglobingehalt des Einzelerythrozyten (10^{-12} g/Zelle; pg)	100	72,63	91,4	66,37	92,0	66,82	84,5	61,40
Hämoglobingehalt/ 100 ml Erythrozyten (g/100 ml)	100	21,06	94,4	20,76	101,1	22,23	100,0	21,98
ATP-Gehalt/1000 ml Erythrozyten (mMol/ 1000 ml)	100	3,97	63,5	2,52	54,2	2,15	30,4	1,21
Anteil Methämoglobin am Gesamthämoglobin (%)	100	1,1	422,7	5,2	843,0	9,2	943,6	10,38

gehalt des Einzelerythrozyten konnte somit durch Erhöhung der Erythrozytenzahl pro Volumeneinheit voll kompensiert werden (Tab. 1).

Auch der Blutzuckerspiegel erhöhte sich innerhalb der Versuchszeit; nach 3 h Einwirkungszeit stieg er im Mittel auf 190 % des Ausgangswertes an (92,8 mg/100 ml). Sowohl der Minimal- als auch der Maximalwert lag zu diesem Zeitpunkt deutlich höher als der Kontrollwert (69,56 mg/100 ml und 108,69 mg/100 ml gegenüber 48,81 mg/100 ml; Tab. 3). Sobald die ersten Vergiftungserscheinungen auftraten, war eine deutliche Zunahme der Streuung der Individualwerte zu beobachten (Abb. 1).

Die nachhaltigsten Veränderungen im Laufe der Behandlung mit Aretit® zeigten der Methämoglobingehalt und der Hämoglobingehalt im Serum. Der mittlere Methämoglobingehalt der Kontrollen betrug 0,072 g/100 ml Blut. Nach 2 h Einwirkungsdauer stieg er auf 0,8 g/100 ml, nach 3 h sogar auf 0,95 g/100 ml. Dies entspricht einem Anteil von 9,2

Tab. 2: Multipler Vergleich der Mittelwerte einzelner Blutparameter bei verschiedener Einwirkungsdauer von 0,2 ppm Aretit®. P = Fehlerwahrscheinlichkeit; N.S. = nicht signifikant; Z = Mittelwert zum jeweiligen Zeitpunkt; 1 = 1 h, 2 = 2 h, 3 = 3 h, 4 = 3,5 h Einwirkungsdauer.

Parameter	$Z_2 - Z_1$	$Z_3 - Z_2$	$Z_3 - Z_1$	$Z_4 - Z^*_{1,2,3}$
Hämoglobin	N.S.	N.S.	$P < 0,05$	
Hämatokrit	N.S.	N.S.	N.S.	
Glucose	N.S.	N.S.	$P < 0,05$	
Erythrozyten	N.S.	N.S.	$P < 0,05$	
Methämoglobin	N.S.	N.S.	N.S.	
Hämoglobin (S.)	N.S.	N.S.	N.S.	
ATP-Gehalt	N.S.	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$

*Vergleich von Z_4 sowohl mit Z_1 und Z_2 und Z_3.

bzw. 10,4 % des jeweiligen Gesamthämoglobingehaltes (Tab. 1). Der Hämoglobingehalt im Serum, der ein Maß für die Hämolyse der roten Blutzellen darstellt, erhöhte sich innerhalb von 3 h auf das 11 fache ($\bar{x}$ = 0,95 g/100 ml) und stieg maximal bis zu 1,96 g Hämoglobin/100 ml Serum an (Abb. 2, Tab. 3). Beide Parameter waren mit Ausnahme des Methämoglobingehaltes nach 1 h signifikant verändert (Tab. 3). Der Multiple Vergleich der Mittelwerte während der Aretit®-Einwirkung zeigte allerdings in keinem Falle eine signifikante Differenz.

Der ATP-Gehalt im Blut war bereits nach 1 h signifikant verändert (Tab. 3). Bis zum Ende des Versuches (3,5 h) sank er auf 11,85 mg/100 ml, was ungefähr 20 % des Ausgangswertes entspricht (Abb. 3). Eine Überlebenszeit von mehr als 3,5 h wurde von keinem Versuchsfisch erreicht, so daß dieser Zeitpunkt in den meisten Fällen 100 % der Überlebenszeit entsprach.[1] Fische, die zu diesem Zeit-

[1] Alle anderen Blutparameter wurden nach 3,5 h nicht mehr erfaßt, da durch die Hämolyse und die stark verkürzte Gerinnungszeit des Blutes eine Verfälschung der Werte nicht auszuschließen war.

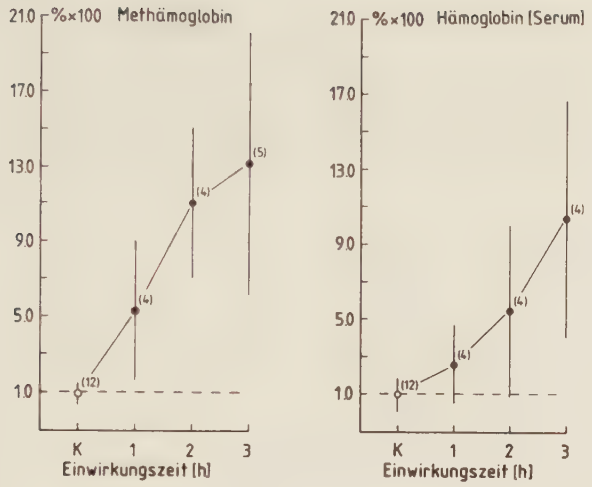


Abb. 2: Mittelwerte und Standardabweichungen der Blutparameter Methämoglobin und Hämoglobin im Serum nach unterschiedlich langer Einwirkungszeit (0,2 ppm). Die Angaben erfolgen in Prozent und sind auf Kontrollwerte bezogen (K = Kontrollwert = 100 %); () = Zahl der Versuchstiere.

punkt ATP-Werte von < 10 mg/100 ml Blut aufwiesen, zeigten schon deutliche Anzeichen von Muskelstarre. Der errechnete absolute ATP-Gehalt von 1 l roter Blutkörperchen sank von 3,97 mMol/l Erythrozyten (Kontrolle) auf 1,21 mMol/l Erythrozyten (Tab. 1).

In dieser Versuchsreihe wurde zusätzlich die Auswirkung einer hochtoxisch wirkenden Giftmenge (0,5 ppm) geprüft. Bereits nach 2 h trat bei den meisten Fischen der Tod ein. Auch hier sanken die ATP-Werte im Mittel um 80 % (Abb. 3). Aus dem Multiplen Vergleich der Mittelwerte geht hervor, daß sich die ATP-Werte (bei Einwirkung von 0,2 ppm) erst zwischen 2 und 3 h, wie auch zwischen 3 und 3,5 h signi-

fikant verringerten. Der stärkste Konzentrationsabfall trat somit erst im letzten Drittel der Überlebenszeit auf. Auch bei Behandlung mit 0,5 ppm fielen die ATP-Werte erst nach mehr als 1 h Einwirkungszeit stark ab. Die Abnahme dieses Parameters erfolgte nicht linear (Tab. 2, Abb. 3).

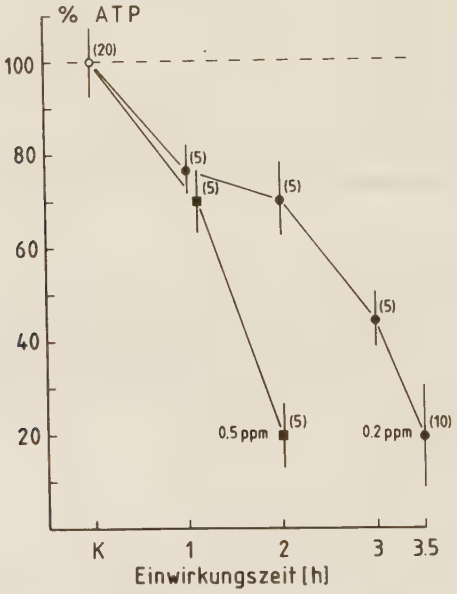


Abb. 3: Mittelwerte und Standardabweichungen des Blutparameters ATP-Gehalt nach unterschiedlich langer Einwirkungszeit von 0,2 und 0,5 ppm Aretit®. Die Angaben erfolgen in Prozent und sind auf Kontrollwerte bezogen (K = Kontrollwert = 100 %); () = Zahl der Versuchstiere.

Tab. 3: Zeitlicher Verlauf der untersuchten Blutparameter nach Einwirkung von 0,2 ppm Aretit®[1]. E = Einwirkungszeit des Pestizids, K. = Kontrolle, n = Zahl der Versuchstiere, $\bar{x}$ = Mittelwert, S.D. = Standardabweichung, S.E. = Standardfehler, min. - max. = Extremwerte, P = Fehlerwahrscheinlichkeit, N.S. = nicht signifikant.

Blutparameter	E. in h	n	$\bar{x}$	S.D.	S.E.	min. - max.		P
Hämoglobingehalt	K	16	6,50	0,36	0,09	5,56	7,10	
g/100 ml	1	10	7,50	0,38	0,12	7,18	8,05	< 0,05
	2	8	8,62	1,04	0,37	7,60	10,15	< 0,05
	3	7	9,15	1,51	0,57	8,56	11,40	< 0,05
Hämatokrit %	K	12	30,86	2,55	0,74	26,0	34,2	
	1	5	36,11	5,31	2,37	31,5	39,1	< 0,05
	2	6	38,76	5,58	2,27	33,0	46,5	< 0,05
	3	6	41,61	3,96	1,62	36,1	45,0	< 0,05
Erythrozyten	K	12	0,90	0,19	0,05	0,80	1,34	
Mio./mm^3	1	4	1,13	0,19	0,09	1,02	1,42	N.S.
	2	4	1,29	0,20	0,10	1,10	1,58	< 0,05
	3	6	1,49	0,15	0,06	1,32	1,60	< 0,05
Glucose	K	12	48,81	9,01	2,60	46,0	57,69	
mg/100 ml	1	6	63,48	15,90	6,49	42,59	79,79	N.S.
	2	6	68,89	18,43	7,52	46,37	98,61	< 0,05
	3	7	92,80	15,20	5,75	69,56	108,69	< 0,05
Methämoglobin	K	12	0,07	0,04	0,01	0,03	0,14	
g/100 ml	1	4	0,39	0,27	0,14	0,14	0,78	< 0,05
	2	4	0,80	0,29	0,15	0,50	1,11	< 0,05
	3	4	0,95	0,50	0,25	0,75	1,69	< 0,05
Hämoglobin im	K	12	0,12	0,11	0,03	0,00	0,33	
Serum g/100 ml	1	4	0,32	0,26	0,13	0,11	0,64	N.S.
	2	4	0,66	0,56	0,28	0,22	1,42	< 0,05
	3	5	1,25	0,76	0,34	0,37	1,96	< 0,05
ATP-Gehalt (0,2 ppm)	K	20	60,04	6,50	1,45	52,50	67,45	
mg /100 ml	1	5	46,33	3,35	1,49	44,23	51,68	< 0,05
	2	5	42,37	4,89	2,19	36,86	48,76	< 0,05
	3	5	26,75	3,80	1,70	23,49	29,97	< 0,05
	3,5	10	11,84	6,65	2,10	2,19	24,09	< 0,05
(0,5 ppm)	1	5	42,25	3,93	1,76	37,66	47,74	< 0,05
	2	5	11,71	4,21	1,88	6,57	17,52	< 0,05

[1] Nur der ATP-Gehalt wurde zusätzlich bei 0,5 ppm untersucht

2. Subakute Intoxikation

Bei einer Behandlung mit 0,07 ppm Aretit® stieg der Hämoglobingehalt innerhalb von 4 h um 1,2 g/100 ml (Normalwert $\bar{x}$ = 6,71 g/100 ml) an. Auch nach 10 h Einwirkungsdauer war er noch signifikant erhöht, fiel jedoch nach 24 h wieder auf den Ausgangswert zurück (Abb. 4, Tab. 6). Die Hämatokritkurve zeigte einen ähnlichen Verlauf. Nach 4 h lag bereits eine Erhöhung um 18 % und nach 10 h um 28 % vor. Eine 24-stündige Einwirkung zeigte keine veränderten Hämatokritwerte mehr (Abb. 4, Tab. 6).
Der Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Zeitpunkte zeigte für Hämatokrit wie auch für Hämoglobin bei nicht direkt benachbarten Mittelwerten signifikante Unterschiede. Beim Vergleich direkt benachbarter Mittelwerte war der 24 h Wert signifikant gegenüber dem 10 h Wert erniedrigt (Tab. 5). Da die Zahl der roten Blutkörperchen schon bei der Gruppe der Kontrollfische beträchtlich variierte, wurde der Anstieg der Erythrozytenzahl erst nach 10 h signifikant. Der Ausgangswert ($\bar{x}$ = 0,99 Mio/mm^3) war dann um 40 % überschritten (Maximalwert 1,62 Mio/mm^3). Bereits nach 24 h lag auch hier der Ausgangswert wieder vor. Der Multiple Vergleich der Mittelwerte ergab wegen der hohen Streuungen der Meßwerte keine Signifikanz (Tab. 5, 6).

Das errechnete Erythrozyteneinzelvolumen sank nach 4 h und besonders deutlich aber nach 10 h. Die individuellen Schwankungen waren auch hier so groß, daß die Wiederherstellung der Ausgangswerte nicht einheitlich erfolgte (Tab. 4).
Der durchschnittliche Hämoglobingehalt des Einzelerythrozyten sank nach 4 h auf 95 % und nach 10 h auf 88 % des Ausgangswertes. Im weiteren Verlauf der Intoxikation kehrten diese Werte schon nach 24 h auf das Ausgangsniveau zurück. Der absolute Hämoglobingehalt pro 100 ml Erythrozyten blieb während der ersten 24 h weitgehend unverändert (Tab. 4).

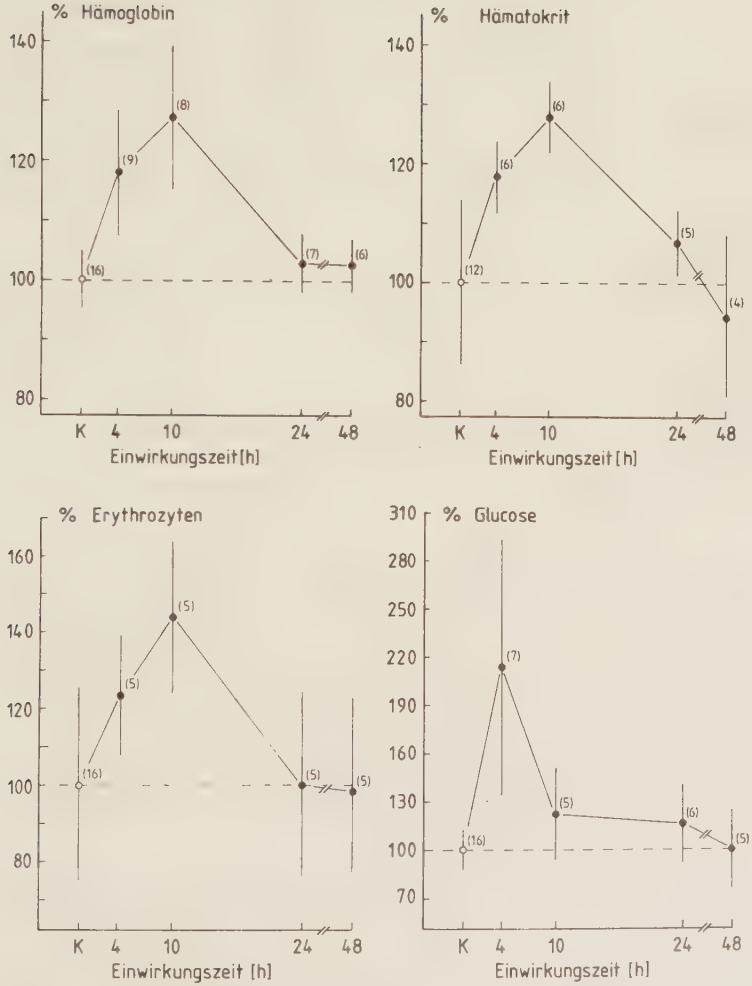


Abb. 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der Blutparameter Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten und Glucose nach unterschiedlich langer Einwirkungszeit (0,07 ppm). Die Angaben erfolgen in Prozent und sind auf Kontrollwerte bezogen (K = Kontrollwert = 100 %); () = Zahl der Versuchstiere.

Tab. 4: Durchschnittswerte errechneter Blutparameter nach unterschiedlicher Einwirkungszeit von 0,07 ppm Aretit®. Die Angaben erfolgen absolut und in Prozent (Kontrollwert = 100 %).

Blutparameter	Kontrolle		4 h		10 h		24 h		48 h	
	%	absolut	%	absolut	%	absolut	%	absolut	%	absolut
Durchschnittliches Erythrozyteneinzelvolumen (10^{-15} l/Zelle)	100	319,6	95,0	303,49	88,6	282,29	105,8	338,0	95,1	304,08
Hämoglobingehalt des Einzelerythrozyten (10^{-12} g/Zelle)	100	67,78	95,1	64,47	88,2	59,79	101,9	69,10	103,9	70,4
Hämoglobingehalt/ 100 ml Erythrozyten (g/100 ml)	100	21,20	100,2	21,24	99,5	21,10	96,4	20,44	109,2	23,15
ATP-Gehalt/1000 ml Erythrozyten (mMol/1000 ml)	100	3,63	57,3	2,08	68,6	2,49	84,0	3,05	109,4	3,97
Anteil Methämoglobin am Gesamthämoglobin (%)	100	1,94	968,6	18,79	1241,8	24,09	485,1	9,41	52,1	1,01

Im Gegensatz zu den bisher genannten Blutparametern zeigte der Blutzuckerspiegel bereits nach 4 h Versuchsdauer die höchste Konzentration. Der Mittelwert der Kontrollen betrug 48,15 mg/100 ml; die Zunahme erreichte nach 4 h (103,0 mg/100 ml) 213 % (Abb. 4). Nach 10 h war der Unterschied bereits nicht mehr signifikant (Tab. 6). Nur der nach 4 h ermittelte Glucosewert unterschied sich von den übrigen Mittelwerten signifikant (Tab. 5).

Bei der subletalen Einwirkung erhöhte sich der Anteil von Methämoglobin nach 4 h um das 11,5 fache und nach 10 h um das 16 fache (Abb. 5). Durchschnittlich lagen nach 10-stündiger Einwirkung 2,06 g/100 ml als oxidiertes Hämoglobin vor; dies entspricht ungefähr 24 % der gesamten Hämoglobinmenge. Auch nach 24 h betrug der Anteil an Methämoglobin trotz einer Annäherung an die Kontrollwerte noch immer 9,4 %. Bei Versuchsende (48 h) bestanden gegenüber den Kontrollfischen keine Unterschiede mehr.

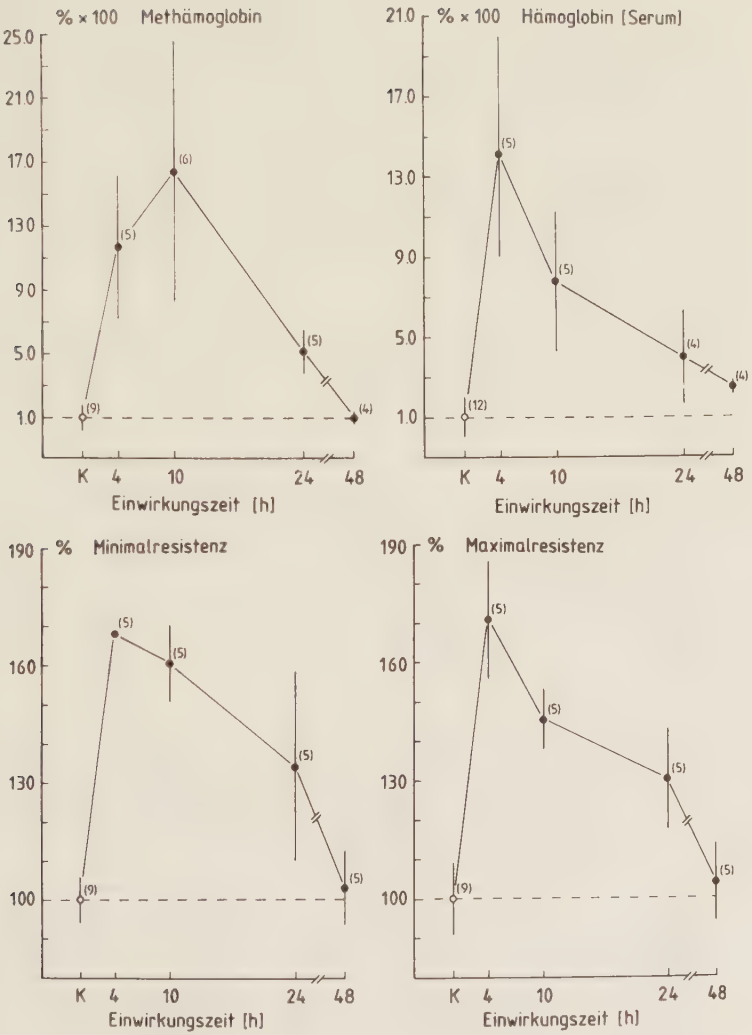


Abb. 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der Blutparameter Methämoglobin, Hämoglobin im Serum, Minimal- und Maximalresistenz nach unterschiedlich langer Einwirkungszeit (0,07 ppm). Die Angaben erfolgen in Prozent und sind auf Kontrollwerte bezogen (K = Kontrollwert = 100 %); () = Zahl der Versuchstiere.

Der Hämolysegrad des Blutes (Hämoglobinanteil des Serums) zeigte innerhalb der ersten 4 h die stärkste Zunahme. In Einzelfällen waren bis zu 2,26 g Hämoglobin in 100 ml Serum enthalten ($\bar{x}$ = 1,49 g/100 ml). Bei den unbehandelten Fischen betrug die Konzentration durchschnittlich 0,1 g/100 ml. Die Annäherung an diese Konzentration erfolgte nur zögernd; auch nach 24 h Einwirkung war der Hämoglobinanteil im Serum noch deutlich erhöht (Abb. 5, Tab. 6). Benachbarte Mittelwerte waren in keinem Fall signifikant verändert (Tab. 5).

Zur Prüfung der osmotischen Resistenz der Erythrozyten wurde die Minimal- und Maximalresistenz bestimmt, d.h. die Konzentration NaCl-Lösung, bei der die ersten Erythrozyten hämolysieren (=minimal), bzw. eine totale Hämolyse auftritt (=maximal). Die Erythrozyten der Kontrollfische zeigten bei 0,43 % beginnende und bei 0,27 % NaCl-Lösung totale Hämolyse. Nach 4-stündiger Einwirkung von Aretit® (0,07 ppm) trat in allen Fällen schon bei 0,7 % NaCl-Lösung Hämolyse auf. Die Maximalresistenz war bereits bei einer

Tab. 5: Multipler Vergleich der Mittelwerte einzelner Blutparameter bei verschiedener Einwirkungsdauer von 0,07 ppm Aretit®. P = Fehlerwahrscheinlichkeit; N.S. = nicht signifikant; Z = Mittelwert zum jeweiligen Zeitpunkt; 1 = 4 h, 2 = 10 h, 3 = 24 h, 4 = 48 h Einwirkungsdauer.

Parameter	$Z_2 - Z_1$	$Z_3 - Z_2$	$Z_4 - Z_3$	$Z_3 - Z_1$	$Z_4 - Z_2$	$Z_4 - Z_1$
Hämoglobin	N.S.	P < 0,05	N.S.	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05
Hämatokrit	N.S.	P < 0,05	N.S.	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05
Erythrozyten	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Glucose	P < 0,05	N.S.	N.S.	P < 0,05	N.S.	P < 0,05
Methämoglobin	N.S.	P < 0,05	N.S.	N.S.	P < 0,05	P < 0,05
Hämoglobin (S.)	N.S.	N.S.	N.S.	P < 0,05	N.S.	P < 0,05
Osmotische Resistenz min.	N.S.	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05
max.	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05
Lactat-Gehalt	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	P < 0,05
ATP-Gehalt	P < 0,05	N.S.	N.S.	P < 0,05	N.S.	P < 0,05

Konzentration von 0,46 % NaCl-Lösung erreicht. Ähnlich wie beim Hämoglobingehalt im Serum kehrte die herabgesetzte Resistenz nur langsam wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Sowohl die minimale als auch die maximale Resistenz waren erst nach 48 h nicht mehr von Kontrollen signifikant zu unterscheiden. Der Multiple Vergleich der Mittelwerte (Tab. 5). zeigte, daß nicht benachbarte Mittelwerte stets, und benachbarte, von einer Ausnahme abgesehen, voneinander signifikant verschieden waren.

Der Lactatgehalt des Blutes war nach 4 h ebenfalls am stärksten erhöht. Er übertraf den Mittelwert der Kontrolle (7,9 mg/100 ml) um das 3 fache (Abb. 6).

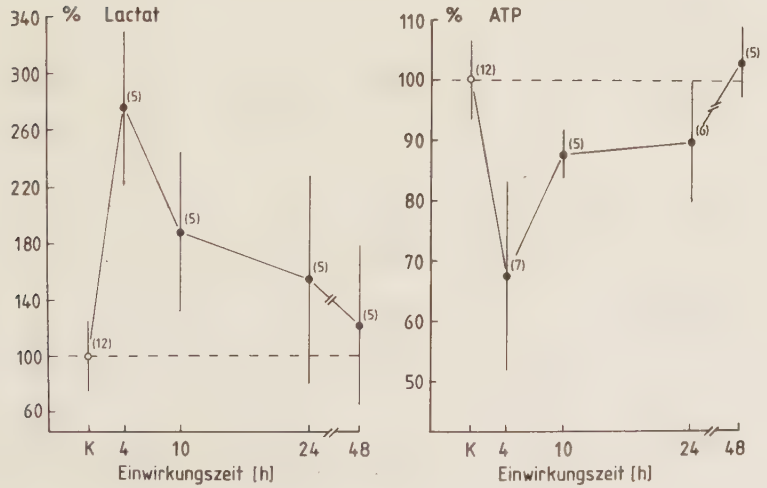


Abb. 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der Blutparameter Lactat- und ATP-Gehalt nach unterschiedlich langer Einwirkungszeit (0,07 ppm). Die Angaben erfolgen in Prozent und sind auf Kontrollwerte bezogen (K = Kontrollwert = 100 %); () = Zahl der Versuchstiere.

Einen mit dem Lactatspiegel im Blut durchaus vergleichbaren Verlauf zeigte der ATP-Gehalt. Der Mittelwert der Kontrollfische betrug 58,35 mg/100 ml. Er sank nach 4 h Einwirkungszeit auf 39,40 mg/100 ml ab. Dies entspricht einer Abnahme um 32,5 % (Abb. 6). Beim Vergleich der Mittelwerte unter Aretit®-Einwirkung war dieser Wert von allen anderen signifikant verschieden (Tab. 5). Nach 10- und 24-stündiger Einwirkung lag der ATP-Gehalt um 12,3 bzw. 10,2 % niedriger als bei den Kontrollen; auch in diesem Fall waren die Unterschiede signifikant. Erst bei Versuchsende hatten sich die Konzentrationen den Kontrollwerten wieder angenähert (Abb. 6, Tab. 6).

Tab. 6: Zeitlicher Verlauf der untersuchten Blutparameter nach Einwirkung von 0,07 ppm Aretit®. E = Einwirkungszeit des Pestizids, K = Kontrolle, n = Zahl der Versuchstiere, $\bar{x}$ = Mittelwert, S.D. = Standardabweichung, S.E. = Standardfehler, min. - max. = Extremwerte, P = Fehlerwahrscheinlichkeit, N.S. = nicht signifikant.

Blutparameter	E. in h	n	$\bar{x}$	S.D.	S.E.	min. - max.		P
Hämoglobingehalt	K	16	6,71	0,34	0,09	6,06	7,32	
g/100 ml	4	9	7,93	0,71	0,24	6,33	8,81	< 0,05
	10	8	8,55	0,82	0,29	7,40	9,43	< 0,05
	24	7	6,91	0,34	0,13	6,32	7,43	N.S.
	48	6	6,90	0,31	0,13	6,38	7,30	N.S.
Hämatokrit %	K	12	31,64	4,0	1,22	24,0	40,0	
	4	6	37,33	2,04	0,34	34,6	40,4	< 0,05
	10	6	40,51	1,94	0,79	38,4	43,8	< 0,05
	24	5	33,80	1,78	0,08	31,4	36,0	N.S.
	48	4	29,80	4,41	2,21	29,0	34,2	N.S.
Erythrozyten	K	16	0,99	0,25	0,06	0,61	1,48	
Mio./mm^3	4	5	1,23	0,16	0,07	0,96	1,38	N.S.
	10	5	1,43	0,20	0,09	1,27	1,62	< 0,05
	24	5	1,00	0,24	0,11	0,68	1,25	N.S.
	48	5	0,98	0,25	0,11	0,71	1,28	N.S.
Glucose	K	16	48,15	6,37	1,59	40,00	62,12	
mg/100 ml	4	5	103,00	40,07	15,15	62,63	161,90	< 0,05
	10	5	59,18	13,83	6,18	43,47	78,26	N.S.
	24	6	56,28	12,17	4,97	42,00	77,61	N.S.
	48	5	48,34	11,94	5,34	32,18	54,76	N.S.
Methämoglobin	K	9	0,13	0,10	0,03	0,03	0,21	
g/100 ml	4	5	1,49	0,58	0,26	0,93	2,40	< 0,05
	10	6	2,06	1,01	0,41	1,00	3,60	< 0,05
	24	5	0,65	0,18	0,08	0,42	0,87	< 0,05
	48	4	0,07	0,05	0,03	0,03	0,12	N.S.
Hämoglobin	K	12	0,10	0,11	0,03	0,02	0,33	
(Serum)	4	5	1,49	0,60	0,27	0,90	2,26	< 0,05
g/100 ml	10	5	0,81	0,37	0,17	0,32	1,28	< 0,05
	24	4	0,42	0,24	0,12	0,25	0,77	< 0,05
	48	4	0,26	0,05	0,03	0,18	0,32	< 0,05

Tab. 6: Fortsetzung

Blutparameter	E. in h	n	$\bar{x}$	S.D.	S.E.	min. - max.		P
Osmotische	K	9	0,43	0,03	0,01	0,40	0,45	
Resistenz minimal	4	5	0,70	-	-	0,70	0,70	< 0,05
% NaCl	10	5	0,68	0,04	0,02	0,60	0,70	< 0,05
	24	5	0,57	0,10	0,04	0,40	0,65	< 0,05
	48	5	0,44	0,04	0,02	0,40	0,50	N.S.
Osmotische	K	9	0,27	0,03	0,01	0,25	0,30	
Resistenz maximal	4	5	0,46	0,04	0,02	0,40	0,50	< 0,05
% NaCl	10	5	0,39	0,02	0,01	0,35	0,40	< 0,05
	24	5	0,35	0,04	0,02	0,35	0,40	< 0,05
	48	5	0,28	0,03	0,01	0,25	0,30	N.S.
Lactat- Gehalt	K	12	7,85	1,96	0,57	5,11	11,28	
mg/100 ml	4	5	21,62	4,26	1,91	16,81	26,02	< 0,05
	10	5	14,60	4,45	2,00	10,07	21,91	< 0,05
	24	5	12,13	6,19	2,77	5,75	20,50	N.S.
	48	5	10,03	4,76	2,13	6,29	16,49	N.S.
ATP-Gehalt	K	12	58,35	4,02	1,16	49,20	62,63	
mg/100 ml	4	7	39,40	9,11	3,44	28,03	52,56	< 0,05
	10	5	51,20	2,41	1,08	47,29	53,43	< 0,05
	24	6	52,41	5,93	2,42	44,67	62,19	< 0,05
	48	5	60,13	3,54	1,58	56,06	65,70	N.S.

3. Veränderungen im Lebergewebe nach letaler und subletaler Aretit®-Einwirkung

Nach der Behandlung der Fische mit 0,07 und 0,2 ppm Aretit® zeigte bereits die makroskopische Betrachtung eine starke Aufhellung des Lebergewebes. Die histologische Untersuchung ließ die Ursache erkennen: Die Lebersinusoide, aber auch die übrigen Gefäße waren nur noch partiell mit Blut gefüllt. Bei allen akut vergifteten Fischen war diese verminderte Blutfüllung deutlich zu sehen (Abb. 7a, b; Abb. 8a, b). Die subletale Intoxikation wirkte wiederum in ähnlicher Weise, war aber zeitlich begrenzt. Nach 48 h war sie in den meisten Fällen im histologischen Bild nicht mehr

erkennbar.
Erhebliche Veränderungen im Gewebe stellten sich dagegen nach 24 bzw. 48 h Einwirkungsdauer (subakut) ein, die bei der 3-stündigen Behandlungsdauer (o,2 ppm) noch nicht vorlagen. Verschiedene Lobuli fielen durch eine Hypertrophie des Parenchyms auf (vor allem nach 24 h Einwirkung), die oft noch mit einer verstärkten Vakuolenbildung einherging und die sich über große Zellbereiche erstreckte (Abb. 9). Im peripheren Bereich geriet das Gewebe teilweise in einen desintegrierten Zustand. Einzelne Kerne wurden pyknotisch. Auch traten nekrotische Leberzellen auf. In einigen Bereichen begann sich das Zellplasma zu entmischen, und es entstanden intrazelluläre Räume, die das Gewebe nahezu durchsichtig machten. Benachbarte Zellen fielen durch starke Azidophilie auf. Die Zellgrenzen konnten hier nur schwer ausgemacht werden (Abb. 10a, b).

Abb. 7a u. b: *Ausschnitte aus gesundem Lebergewebe (Kontrollen).*

Innerhalb des Lobulus hepatis ist die Zentralvene (Cv) erkennbar, um die die Leberzellen radiär angeordnet sind (Nigrelli und Jakowska 1961). Die parenchymatischen Zellen (P) werden von den Sinusoiden (S) so getrennt, daß es zu einer jeweils 2-schichtigen Zellanordnung kommt.

Abb. 8a u. b: *Leber nach 2 h Exposition eines Versuchsfisches bei 0,2 ppm.*

Die deutlich sichtbaren Sinusoide (S) sind nur noch partiell mit Blut gefüllt(→). In der Zentralvene (Cv) sind nur wenige Erythrozyten sichtbar.

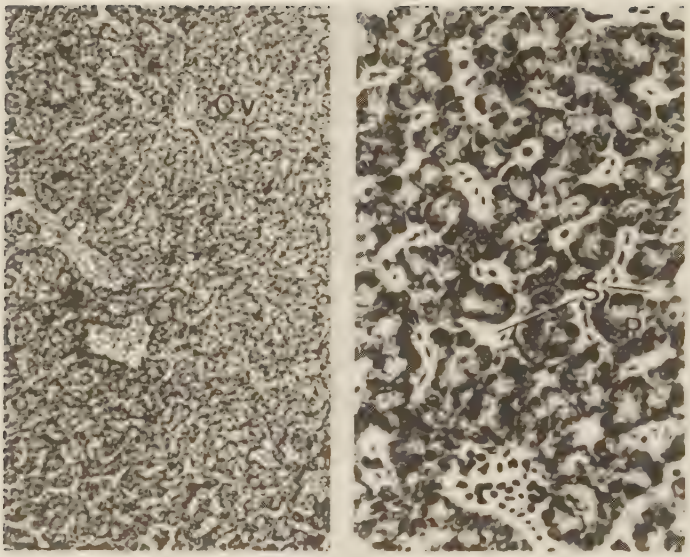
Abb. 9: *Leber nach 24 h Exposition eines Versuchsfisches bei 0,07 ppm.*

Die Parenchymzellen sind hypertrophiert, die Sinusräume dementsprechend verkleinert (→). Viele Zellen besitzen Vakuolen (V).

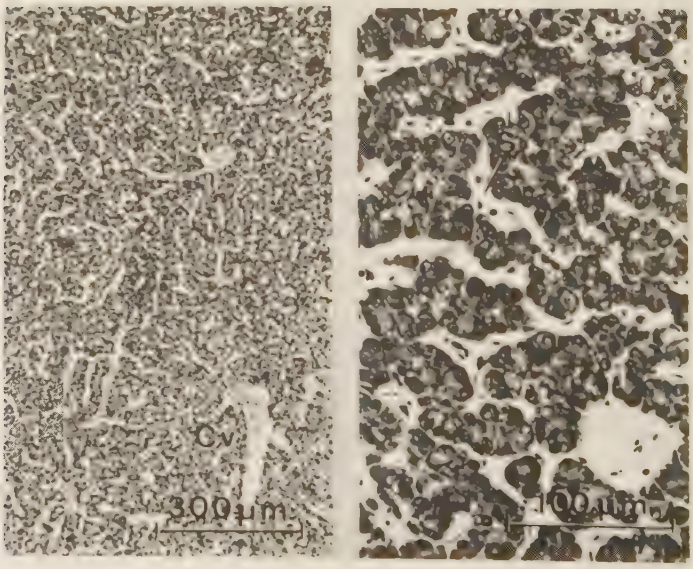
Abb. 10: *Leber nach 48 h Exposition eines Versuchsfisches bei 0,07 ppm.*

a) Die Leberzellen sind vakuolisiert (V), teilweise ist das Plasma vollständig entmischt. Zytoplasmatische Bereiche werden dadurch glasklar (→), andere weisen eine starke Azidophilie (A) auf.

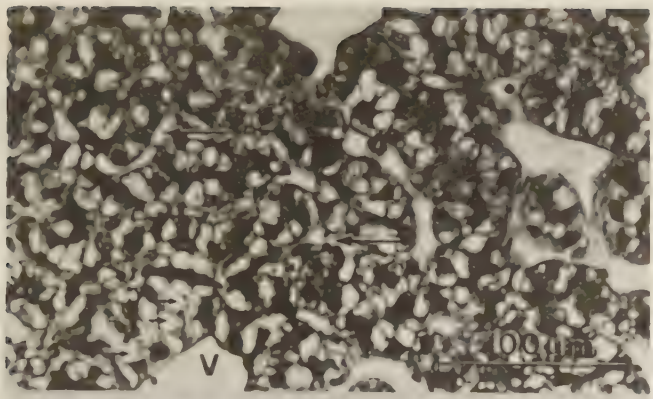
b) Plasmaentmischung (→) und Azidophilie; die Zellgrenzen sind kaum mehr zu erkennen.



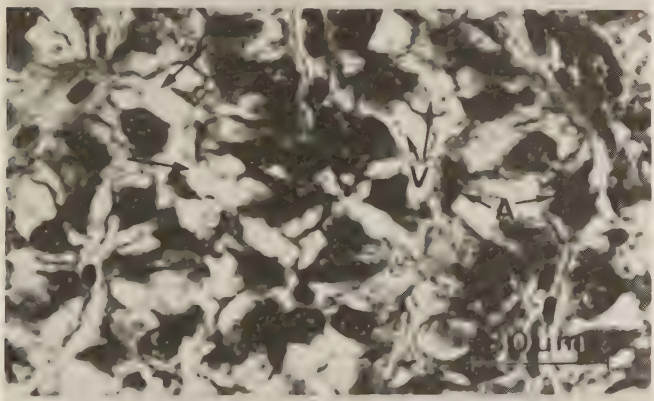
7a, b



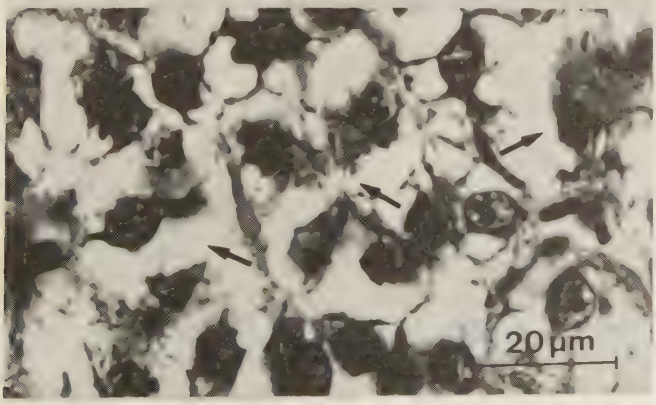
8a, b



9



10a



10b

B. Histopathologie der Kiemen

1. Lichtmikroskopische Untersuchungen nach akuter Intoxikation

Die akute Aretit®-Vergiftung verursachte unterschiedliche Reaktionen im Kiemengewebe. Nur ausnahmsweise zeigten sich schon nach 1 h Einwirkungszeit geringfügige pathologische Veränderungen wie z.B. Hypertrophie des Epithels an den Sekundärlamellen (Abb. 12). Die Spitze der Lamellen war verschiedentlich keulenartig verdickt. Wesentlich deutlicher traten die Veränderungen nach 2-stündiger Herbizid-Einwirkung auf. Der proximale Abschnitt zahlreicher Sekundärlamellen am Kiemenblatt zeigte Anschwellungen (Abb. 13b), die sich nach 3 h Exposition auch auf den distalen Bereich ausdehnten (Abb. 14a).

Abb. 11: Kontrollkieme von Salmo gairdneri.

a) Anordnung der Atemfalten auf beiden Seiten des Kiemenblatts.

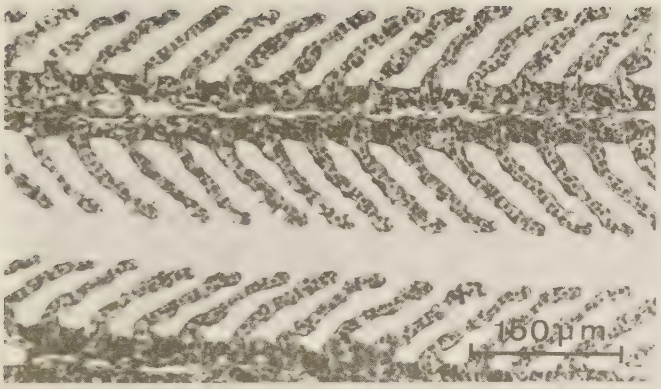
b) Semi-Dünnschnitt durch eine Hälfte des Kiemenblattes. Sekundärlamellen mit respiratorischem Epithel (E = Erythrozyt, Ep = Epithelzelle, P = Pfeilerzelle).

Abb. 12: 1 h Exposition (0,2 ppm). Anschwellen der Sekundärlamelle zu "Endknöpfchen"; subepitheliale Spaltenbildung (→).

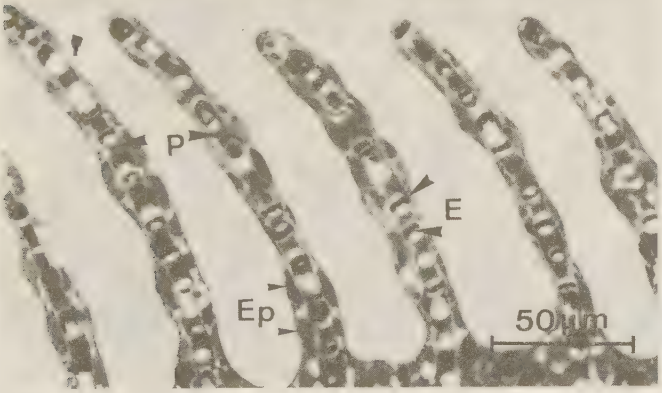
Abb. 13: 2 h Exposition (0,2 ppm).

a) Abrundung von Epithelzellen (→) und beginnende Zellnekrose.

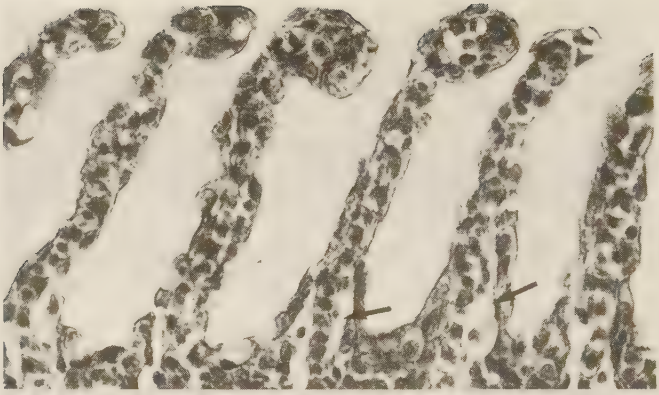
b) Allgemeine Hypertrophie der Atemfalten.



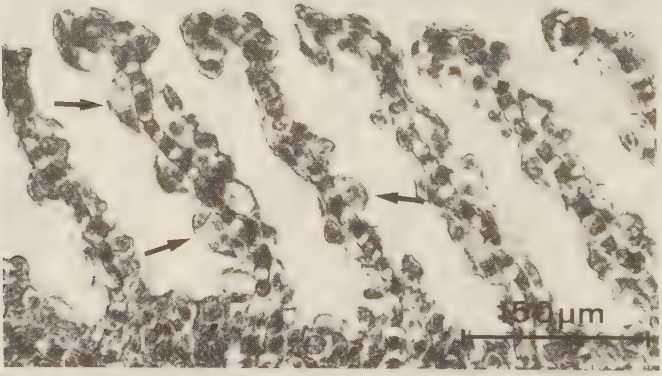
11a



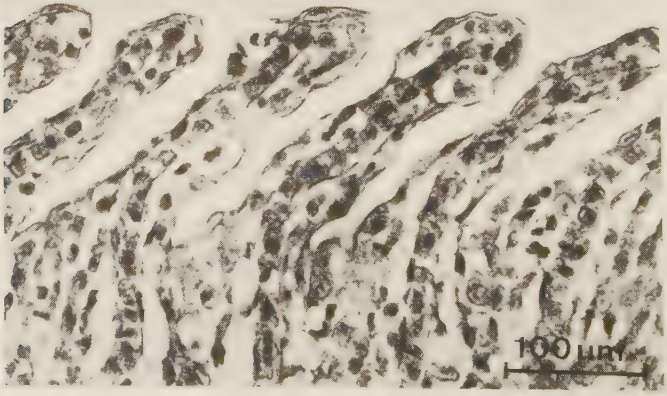
11b



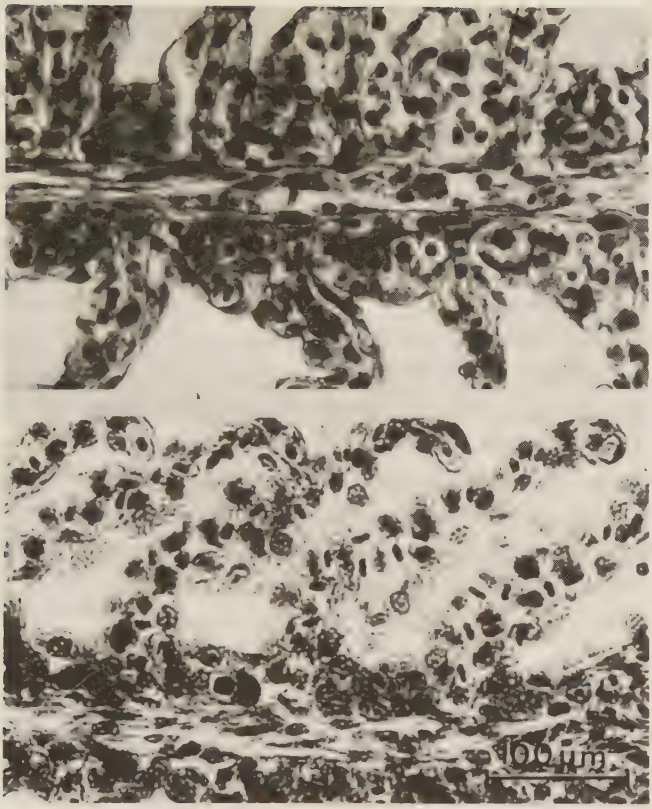
12



13a



13b



14a

14b

Abb. 14: 3 h Exposition (0,2 ppm).

a) Hypertrophie des Epithels am Kiemenblatt und an den Sekundärlamellen.

b) Verschleimung der Oberfläche der Sekundärlamelle.

An verschiedenen Stellen degenerierte das Epithel der Kieme. Durch Zytolyse im Bereich des mehrschichtigen Kiemenblattepithels bildeten sich flüssigkeitsgefüllte Hohlräume, entweder in Form einzelner Vakuolen oder in Form von Spalträumen (Abb. 12). Auch beim respiratorischen Epithel fielen örtlich Hypertrophien und Zellnekrosen auf. Die Zellen rundeten sich ab und verloren ihre normale Gestalt. Die Sekundärlamellen erhielten dadurch das Aussehen einer "Perlenkette". Bei fortschreitender Vergiftung degenerierten die Zellen total. Zurück blieb nur eine strukturlose Zellhülle, sowie ebenfalls degenerierende Pfeilerzellen (Abb. 13a).
Im proximalen Bereich der Sekundärlamellen traten nach 2-3 h Behandlung mit Aretit® auch verstärkte Schleimabsonderungen auf (Abb. 14b). Diese Reaktion war häufig mit einer Vermehrung der Schleimzellen verbunden.
Alle angeführten Läsionen waren nur andeutungsweise von der Einwirkungszeit des Schadstoffes abhängig. Die uneinheitlichen Auswirkungen lassen sich nur durch eine individuell sehr unterschiedliche Reaktion erklären.

2. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen nach subakuter Intoxikation

Die niedrigere Konzentration von Aretit® (0,07 ppm) zeigte nach 4 h Behandlung nur geringe Auswirkungen. Am häufigsten trat eine lokale Hypertrophie des respiratorischen Epithels an den Sekundärlamellen auf. Die histologischen Bilder entsprachen weitgehend den bei 0,2 ppm nach 1-2 h Einwirkungsdauer ermittelten Veränderungen. Daneben zeigte sich eine Hyperämie und eine damit verbundene Erweiterung des zentralen Venensinus. Dieser Teil des

arterio-venösen Systems der Kiemen liegt zwischen dem Kiemenknorpel und der efferenten Primärarterie und erstreckt sich über die ganze Länge des Kiemenblattes. Bei der Forelle ragen in regelmäßigen Abständen Fortsätze des Kiemenknorpels in den Venensinus hinein (Laurent und Dunel 1976). Durch die starke Blutfüllung erschien er jeweils zwischen diesen Knorpelfortsätzen, besonders aber im proximalen Bereich der Kiemenblätter, stark erweitert (Abb. 15a).

Nach 10 h Einwirkungszeit zeigten sich in den Sekundärlamellen die ersten Hämatome und Faltungen (Abb. 16a, b). Die Hämatome waren mit Erythrozyten, Blutplasma, Epithelzellen und Zellfragmenten angefüllt. Bei Überdehnung des Gewebes hob sich das Epithel von den Endothelzellen ab. In den Bereichen mit innerer Blutung kam es zu einer lymphozytären Infiltration. Auch nach 24-stündiger Einwirkung der Substanz traten noch ähnliche Bilder auf (17a, b, c). Nach 48 h Behandlung der Fische war nur noch eine allgemeine Gewebsdilatation zu erkennen (Abb. 18c).

Abb. 15: Hyperämie und Erweiterung des zentralen Venensinus (CVS). Der Schnitt wurde durch den zentralen Venensinus im Kiemenblatt geführt. Die Fortsätze des Knorpelstrahls (F) engen den Sinus ein.

Abb. 16: Veränderungen im Kiemengewebe nach 10 h Exposition der Fische (0,07 ppm).

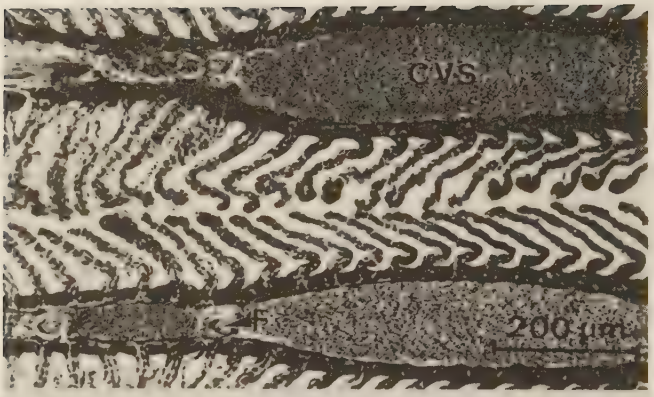
a) Hämatome im distalen Bereich der Atemfalten.

b) Hämorrhagien verbunden mit starker Faltung der Sekundärlamellen.

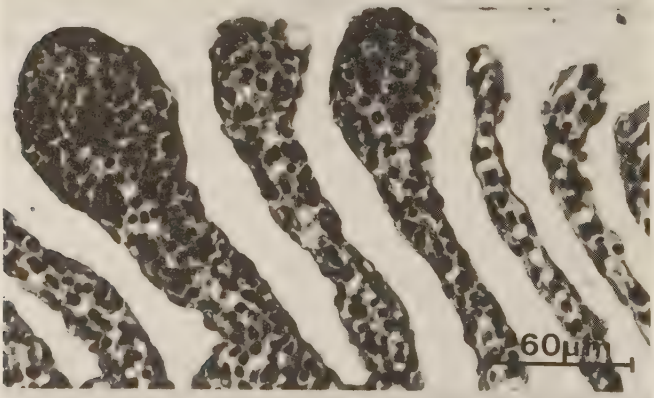
c) Hämatom am Kiemenblatt.

d) Köpfchenförmige Anschwellung im distalen Bereich der Sekundärlamellen.

e) Aneinanderlegen von einzelnen Lamellen (→).

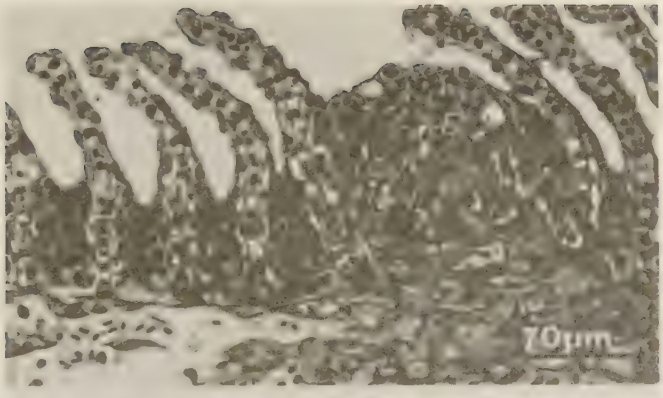


15

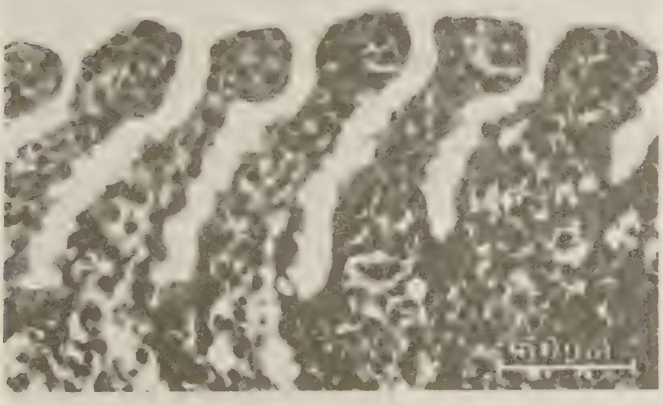


16a

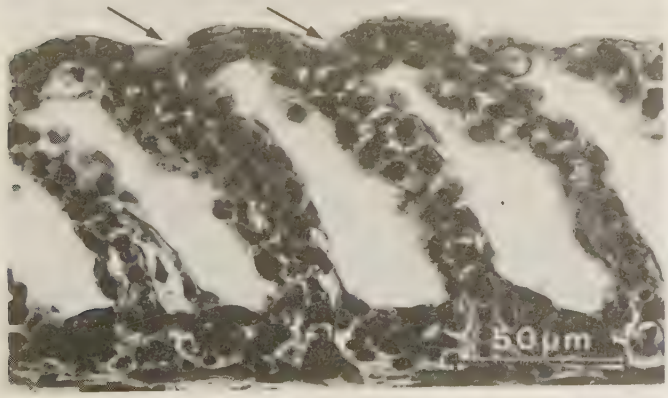
16b



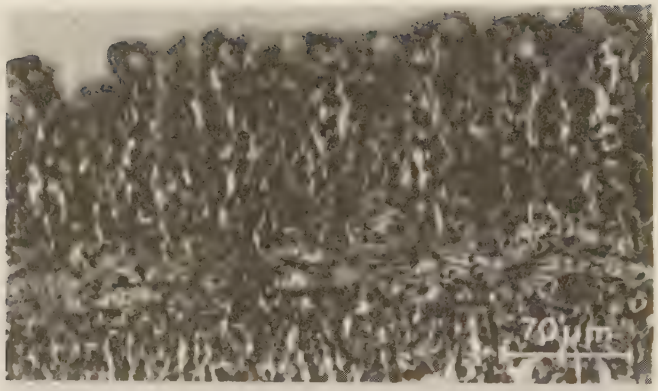
16c



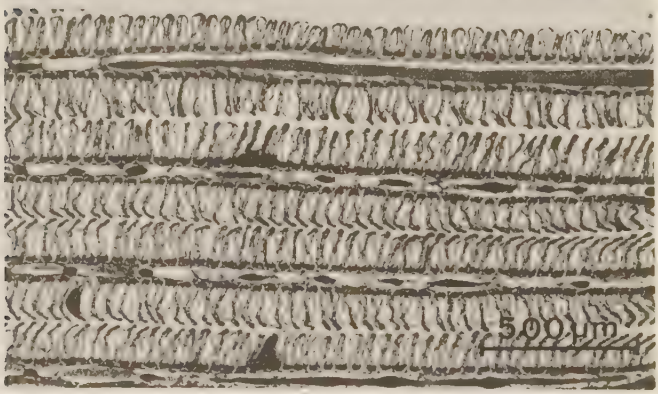
16d



16e



16f



16g

Abb. 16: Fortsetzung.

f) Überwucherung der respiratorischen Oberflächen mit hyperplastischem Gewebe. Die Atemfalten sind nur schwer zu erkennen.

g) Vollständige Epithelablösung über mehrere Kiemenblätter; dazwischen einzelne Hämatome.

Daneben stellten sich aber wie bei akuter Vergiftung starke Epithelwucherungen ein. Besonders an dem mehrschichtigen Epithel des Kiemenfilamentes zeigten sich Hyperplasien. Es kam dabei zu partieller bis vollständiger Überwucherung der Lamellen, bei gleichzeitiger Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen in die zwischen den Lamellen liegenden Räume. Die O_2-Aufnahme mußte in diesen Bereichen stark erschwert sein (Abb. 16f, 17c). Auch das respiratorische Epithel der Lamellen zeigte im gesamten Bereich, besonders aber an der Spitze, Epithelproliferationen. Es bildeten sich "Köpfchen" und keulenförmige Anschwellungen, die teilweise engen Kontakt mit benachbarten Lamellen hatten (Abb. 16d, e).
Nach 10 h Einwirkungszeit konnte eine Abhebung oder Ablösung des Epithels von den Pfeilerzellen und die Bildung subepithelialer Spalten beobachtet werden (Abb. 16g). In den Epithelzellen ließen sich auch pyknotische Kerne erkennen; ferner lösten sich ganze Zellverbände auf. Die Gewebsrupturen traten frühestens nach 24 h Exposition auf. Die Entblößung der Pfeilerzellen und der sie umschließenden "Kapillarräume" führte zu Blutungen im Bereich zwischen den Sekundärlamellen.

Abb. 17: Veränderungen im Kiemengewebe nach 24 h Exposition der Fische (0,07 ppm).

a) Gruppe von 3 Hämatomen an der Lamellenspitze.

b) Hämatome mit Epithelablösungen (→).

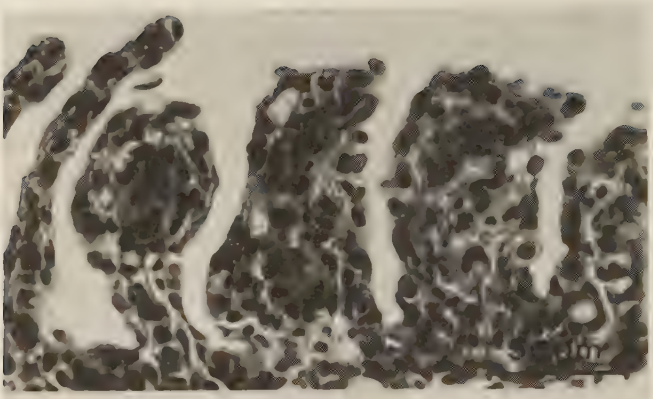
c) Hyperplasie des Kiemenblattepithels.

Abb. 18: Regeneration des Kiemengewebes nach 48 h Exposition der Fische (0,07 ppm).

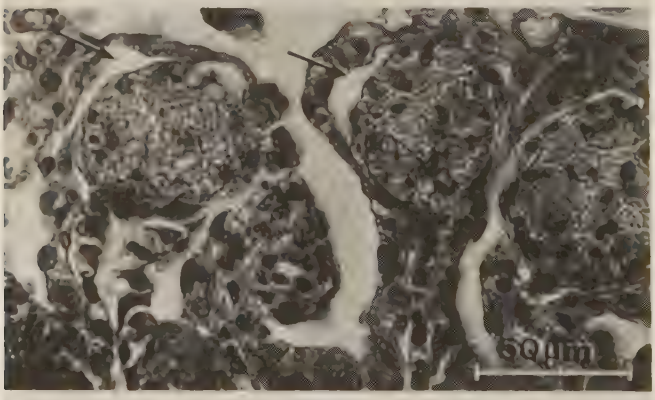
a) Verbleibende Hypertrophie in einzelnen Bereichen.

b) Abhebung des Epithels der Kiemenblätter (→).

c) Allmählicher Rückgang der Hyperämien im zentralen Venensinus.

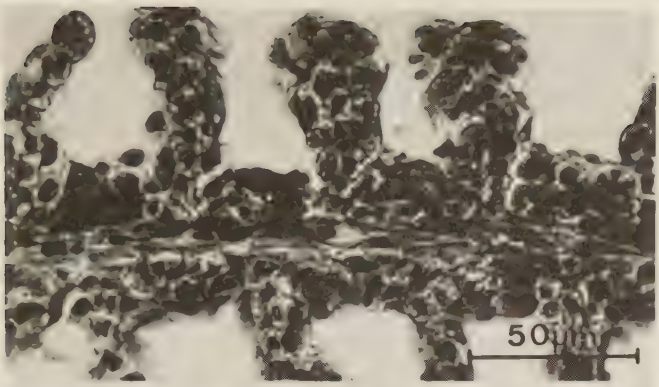


17a

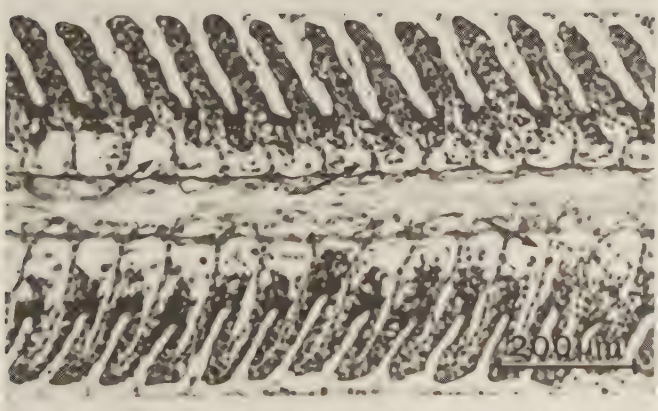


17b

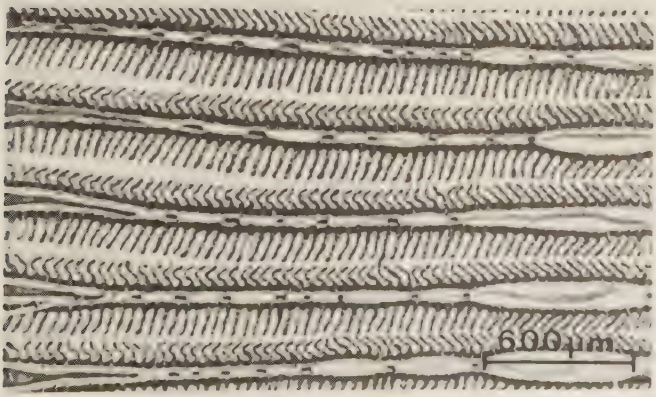
17c



18a



18b

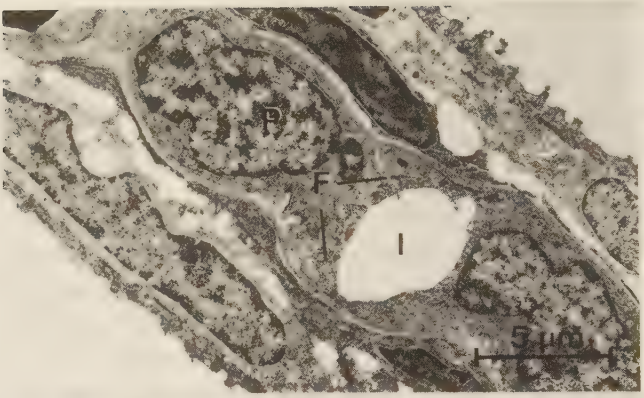


18c

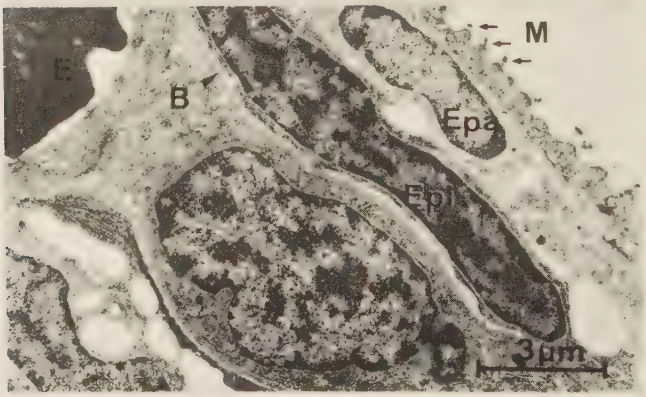
Typische Hämatome, degenerierte Pfeilerzellen und Epithelablösungen traten oftmals nach 10 und 24 h Intoxikation (0,07 ppm) nebeneinander auf. Sie waren jedoch nach weiteren 24 h nicht mehr zu finden.
Nach 48 h, spätestens nach 72 h zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen im Kiemengewebe mehr. In den Bereichen ehemaliger großer Hämorrhagien kam es zur Abschuppung des gesamten Epithels. Die Hohlräume waren teilweise mit Flüssigkeit gefüllt (Abb. 18a, b). Alle beschriebenen Veränderungen des Kiemengewebes waren wie bei akuter Vergiftung auf einzelne Kiemenabschnitte beschränkt und individuell sehr unterschiedlich.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten nur an wenigen Kiemenblättern einzelner Fische durchgeführt werden. Sie sind im Zusammenhang mit den lichtmikroskopischen Untersuchungen zu sehen. In Abb. 19a, b sind 2 typische Längsschnitte durch eine Sekundärlamelle (Kontrolle) dargestellt. Sie zeigen alle bekannten Strukturen der Lamelle (Temmink 1983, Morgan und Tovell 1973, Hughes und Wright 1970).
Die bereits lichtmikroskopisch festgestellte Schwellung und Umbiegung der Lamellenspitzen nach 24 h Behandlung der Fische ließ im elektronenmikroskopischen Bereich ein aufgelockertes Epithelgewebe mit vergrößerten Interzellularräumen und "lymphatischen" Ektasien erkennen (Abb. 20a). Einzelne Vakuolen erweiterten sich zu größeren Spalträumen; eine granulozytäre und lymphozytäre Infiltration lag vor (Abb. 20b, c, d). Neben dem verstärkten Wachstum des Kiemengewebes traten proliferative Zellvermehrungen an der Oberfläche auf. Hierbei handelte es sich um eine Vermehrung von Epithelzellen und undifferenzierten, plasmaärmeren Zellen. In unmittelbarer Nähe fanden sich auch vermehrt in Auflösung begriffene Zellorganelle (Abb. 20e, f). Die im lichtmikroskopischen Bild vermehrt auftretenden acidophilen Zellen erwiesen sich bei elektronenmikroskopischer Auflösung als Chloridzellen. Sie lagen besonders

häufig im distalen Bereich der Sekundärlamellen (Abb. 20g). Verschiedentlich war bereits eine Degeneration erkennbar (Abb. 20i). Im Bereich des Marginalkanales zeigten die Epithelzellen die gleiche Tendenz, wobei die zytoplasmatischen Brücken zwischen den Zellen abgebrochen waren. Bei stark geschädigten Sekundärlamellen waren auch die Pfeilerzellen geschädigt. Der zentrale Zellkern und das Perikaryon erschienen "komprimiert" oder abgerundet (Abb. 20e, i). Die Zellausläufer (flanges) zeigten Falten und verkleinerten den von ihnen begrenzten Blutraum (Abb. 20h). Auch die darüberliegende Basalmembran war hiervon betroffen. Sie war gegenüber den Kontrollen verdickt; an verschiedenen Stellen waren die 3 Schichten miteinander verschmolzen, stark gefaltet und zeigten lokale Degeneration (Abb. 20e, g).



19a



19b

Abb. 19 a) und b): Längsschnitt durch eine Sekundärlamelle einer Kontrollkieme. Die zentralen Pfeilerzellen (P) umkleiden mit ihren "flanges" (F) Interzellularräume (I), welche teilweise mit Erythrozyten (E) gefüllt sind. Sie werden von einer äußeren (Epa) und inneren Epithelschicht (Epi) umgeben. Die äußere Oberfläche des respiratorischen Epithels wird durch einen Mikrovillisaum (M) gebildet. Zwischen Epithel und Pfeilerzellen liegt eine Basalmembran (B).

Abb. 20: Schädigungen der Sekundärlamellen nach 24 h Exposition der Fische (0,07 ppm).

a) Umbiegen des distalen Endes der Sekundärlamelle und des Marginalkanales (M). Vergrößerung der "Lymphräume" (→).

b) Gewebshypertrophie durch Vergrößerung der "Lymphräume" zu interepithelialen Spalten (IS). Das Epithel beginnt sich abzulösen (→).

c) Verstärktes Auftreten von Epithelzellen im distalen Bereich der Atemfalte (K = Kern einer Epithelzelle).

d) "Lymphatische" Ektasie zwischen äußerer und innerer Epithelschicht (→).

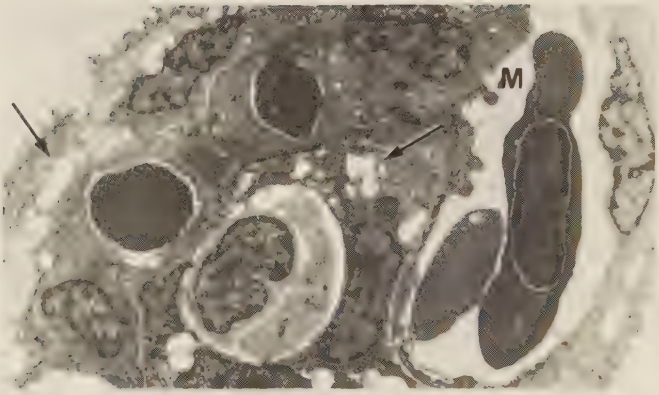
e) Auftreten von hyperplastischem Epithelgewebe mit unterschiedlicher Elektronendichte; beginnende Desorganisation des Zellverbandes. Die Basalmembran ist lokal stark gefaltet und gegenüber den Kontrollen verdickt (→); M = Marginalkanal.

f) Degenerierende Zellbestandteile (→); K = Kern einer Epithelzelle.

g) Vermehrtes Auftreten von Chloridzellen (Cl), deren Mitochondrien teilweise degeneriert sind; starke Verfaltung der Basalmembran im Bereich des Marginalkanales (→); KP = Kern einer Pfeilerzelle.

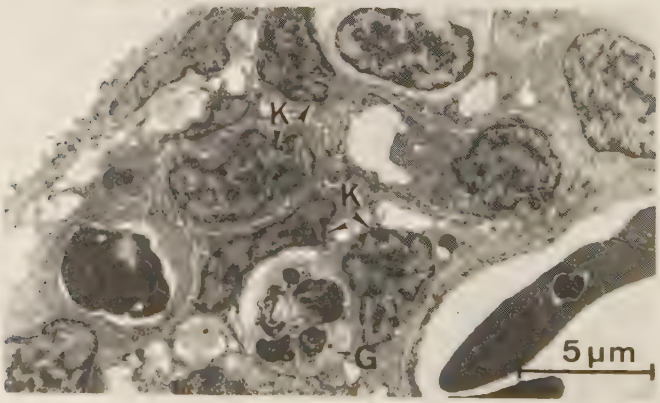
h) Komprimierung von Bluträumen im distalen Bereich einer Sekundärlamelle (→); benachbart liegt eine Chloridzelle (Cl).

i) Pfeilerzelle (P), deren Perikaryon sich von den Zellausläufern zu lösen beginnt. Nur noch an wenigen Stellen bestehen Zellbrücken (→). Auch die Chloridzelle (Cl) zeigt die Tendenz zur Abrundung.

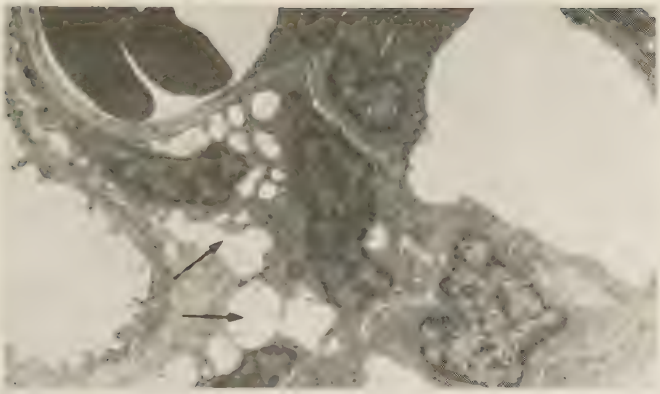


20a

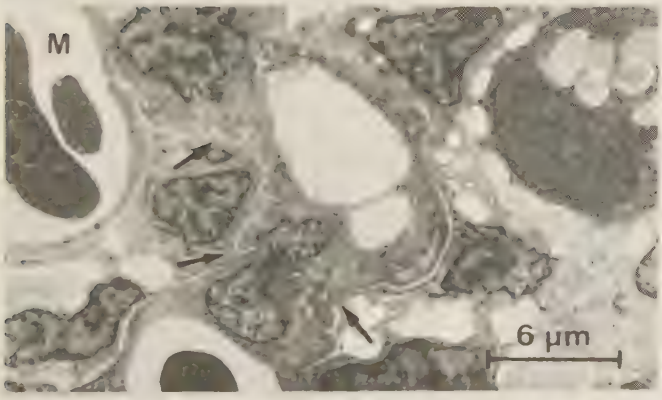
20b



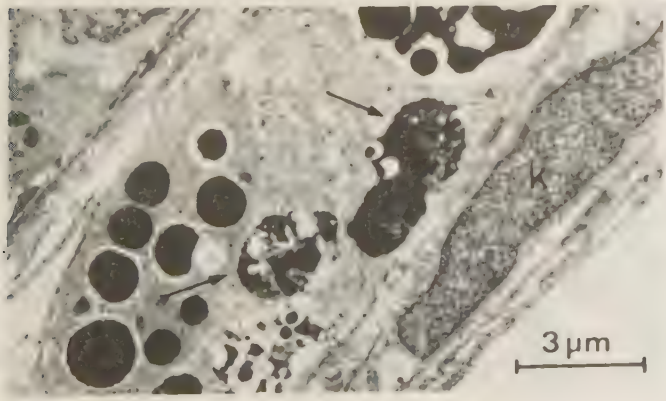
20c



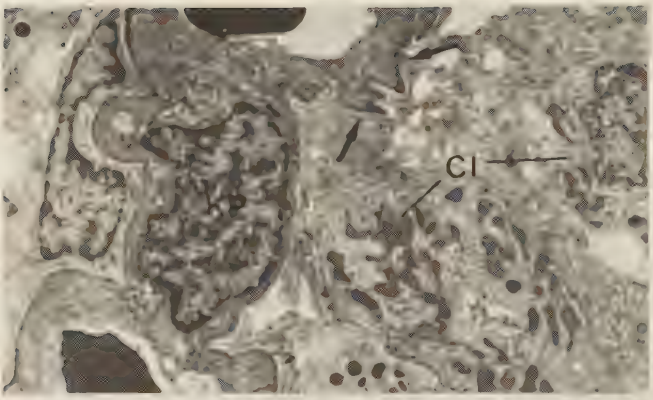
20d



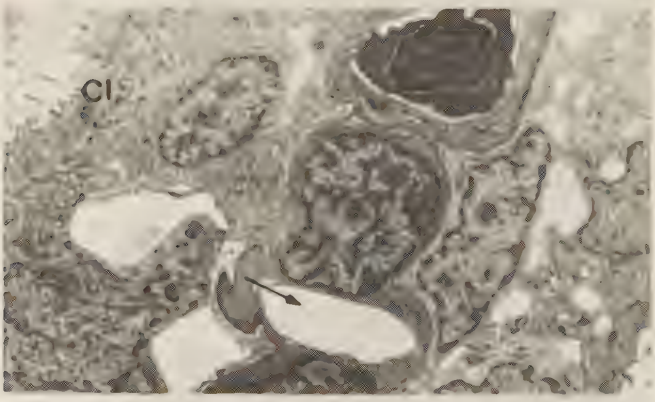
20e



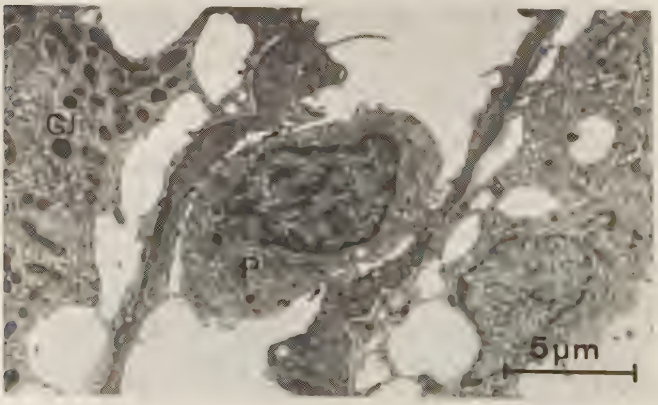
20f



20g



20h



20i

V. Diskussion

Hämatologische Untersuchungen ergeben bei der Kontamination von Fischen mit Pestiziden in der Regel die ersten Hinweise auf eine Vergiftung (Zusammenfassung bei Jülich 1981). In besonderem Maße gilt dies für die Parameter Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten und Glucosekonzentration. In Tab. 7 sind alle signifikanten Veränderungen dieser Parameter nach akuter und subakuter Intoxikation mit Aretit® (1 - 48 h, 0,07 und 0,2 ppm) zusammengefaßt.

Obwohl bereits nach 2-stündiger Einwirkungsdauer bei allen Parametern signifikante Veränderungen vorliegen, sind diese nicht wirkstoffspezifisch. Ähnliche Verschiebungen im Blutbild treten nach McKim et al. (1970) und Schiffmann und Fromm (1959) auch bei Chrom- und Kupfervergiftungen (Salmo gairdneri, S. salvelinus) auf. Auch Ammoniak führt zu erheblichem Anstieg der Hämoglobinkonzentration sowie der Zahl der Erythrozyten (Körting 1968). Pflanzenbehandlungsmittel aus verschiedenen Substanzklassen verursachen bei Salmo gairdneri und Cyprinus carpio eine Steigerung des Hämoglobingehaltes, des Hämatokrit und der Erythrozytenzahl (Jülich 1981, Holmberg et al. 1972). Veränderungen im Blutbild stellten sich bei Fischen sogar nach erhöhter Bewegungsaktivität ein (Black 1955, Casillas und Smith 1977). Auch Hyperglykämien können durch verschiedene Ursachen entstehen (Albrecht 1977, Black et al. 1966, Chavin und Young 1970, Hille 1982, Neville 1979, Silbergeld 1974, Swift 1981, Tandon und Joshi 1973, Watson und McKeown 1976).

Die nach den Aretit®-Behandlungen ermittelten Veränderungen sind somit unspezifisch und lassen sich möglicherweise auch auf die allgemeine Streßsituation im Organismus zurückführen. Es fällt auf, daß die Veränderungen im Blutbild nach 24 h und vor allem nach 48 h Einwirkung (subakute Dosis) in den meisten Fällen nicht mehr signifikant sind, was auf eine relativ kurzfristige Überwindung der Situation hindeutet.

Tab. 7: Signifikanzprüfung von Blutparametern auf Unterschiedlichkeit gegenüber Kontrollwerten bei unterschiedlich langer Einwirkungszeit (+ = signifikant verändert, - = nicht signifikant verändert).

a) 0,2 ppm Aretit®.
b) 0,07 ppm Aretit®.

a) Blutparameter	1 h	2 h	3 h	
Hämoglobin	+	+	+	
Hämatokrit	+	+	+	
Erythrozyten	-	+	+	
Glucose	-	+	+	
b) Blutparameter	**4 h**	**10 h**	**24 h**	**48 h**
Hämoglobin	+	+	-	-
Hämatokrit	+	+	-	-
Erythrozyten	-	+	-	-
Glucose	+	-	-	-

Damit sind auch die möglichen Auswirkungen auf das Lebergewebe interessant. Die letale Intoxikation, die sehr rasch abläuft, führt in der Leber noch zu keinen histopathologischen Veränderungen. Diese treten dagegen bei längerfristiger subletaler Intoxikation auf, nachdem das äußere Erscheinungsbild der Vergiftung bereits im Abklingen ist. Im Leberparenchym zeigen sich Hypertrophie, Pyknose, Zytolyse, Vakuolisation, Nekrosen sowie Entmischungsvorgänge im Zellplasma. Die Frage nach der Spezifität der Bilder muß jedoch wiederum verneint werden. Ähnliche Erscheinungen treten bei Cyanid- und Alkaloidvergiftungen auf (Dixon und Leduc 1981, Hendricks et al. 1981). Auch Ammonium, das Herbizid Dowpon, chlorierte Kohlenwasserstoffe und verschiedene Phenolderivate führen zu ähnlichen histologischen Veränderungen (Smith und Piper 1975, Schulz 1971, Mathur 1962, Waluga 1966, Owen und Rosso 1981). Nach Couch (1975) gibt es bislang im Lebergewebe der Fische noch keine spezifischen Reaktionen gegenüber Bioziden.

In unmittelbarem Kontakt mit dem Giftstoff stehen während der gesamten Einwirkungszeit die Kiemen. Von ihrer Schädigung sind wichtige Hinweise auf den Wirkort und den Mechanismus der Intoxikation zu erwarten. Die in zahlreichen Versuchen ermittelten histopathologischen Bilder ergeben jedoch - weder bei akuter noch bei subakuter Intoxikation - giftspezifische Gewebsveränderungen. In mehr oder weniger vergleichbarer Form reagieren die Fischkiemen auf die Applikation verschiedener Giftstoffe. So wurden zum Beispiel Epithelschwellungen, verstärkte Schleimabsonderungen, Gewebsektasien und Desquamation von Epithelien nach Einwirkung von Ammonium, Phenol und Detergentien festgestellt (Smart 1976, Kuhn und Koecke 1956, Mitrovic et al. 1968, Kristofferson et al. 1973, Brown et al 1968). Cadmium, Chrom, Zink, Ammonium und eine ganze Reihe verschiedener Biozide führen in den Kiemen zu Hypertrophie, Hyperplasie und Zytolyse (Smart 1976, Eller 1971, van der Putte und Pärt 1982, Cope 1965, Mc Craren et al. 1969, Tuurala und Soivio 1982, Schulz 1970).

Hämorrhagien treten bei der Aretit®-Vergiftung erst nach längerfristiger Exposition auf. Diese pathogen-histologische Reaktion ist vermutlich zeitgebunden und die maximale Gewebsantwort nach vorausgehender Schwellung, Fusion und Abhebung einzelner respiratorischer Epithelien. In ähnlicher Weise treten nach der Einwirkung von Detergentien (Brown et al. 1968, Abel und Skidmore 1975), Zinksulphat (Skidmore und Tovell 1972), aquatischen Herbiziden (Leung et al. 1983), verschiedenen Insektiziden (Jauch 1979) und Phenolen (Kuhn und Koecke 1956) innere Blutungen auf. Die nach Aretit®-Behandlung erzielten Hyperämien und die damit verbundene Erweiterung im zentralen Venensinus spezifizieren möglicherweise die Intoxikation durch Phenole, da sie bis jetzt nur unter Einfluß von Nitrophenol (Christie und Battle 1963) und Phenol (Waluga 1966) beschrieben wurden. Dagegen ist die in diesem Zusammenhang aufgetretene leucozytäre Infiltration eine typisch inflammatorische Reaktion, die auch von Brown et al. (1968), Skidmore und Tovell

(1972), Smith und Piper (1972) und Temmink et al. (1983) nach Einwirkung verschiedener Stoffe beobachtet wurde. Bei keinem der Schadbilder des Kiemengewebes liegt ein eindeutig Aretit®-spezifischer Befund vor. Auf der Suche nach diagnostisch verwertbaren pathologischen Reaktionen scheiden somit auch die Kiemen als primäre Wirkorte aus. Dafür spricht auch, daß bei akuter Intoxikation mit Überlebenszeiten von 2 - 3 h histopathologische Schädigungen nicht feststellbar bzw. geringer sind als bei subletal vergifteten Fischen. Die organischen Reaktionen sind somit eher zeit- als konzentrationsabhängig. Über ähnliche Verhältnisse berichten Abel und Skidmore (1975) bei Intoxikation mit Detergentien. Eine ebenso große Variation im Ausmaß der Schädigung fanden Temmink et al. (1983) und Brown et al. (1968) nach Intoxikation mit Chromat und Zink.

Auch die gravierendsten, durch Aretit® ausgelösten Defekte, erreichen nicht das Ausmaß zahlreicher anderer Umweltgifte. So führen zum Beispiel verdünnte Säuren und Laugen (Kuhn und Koecke 1956) wie auch hohe Konzentrationen von Chlor, Formol, Phenol, Ölen, Schwermetallen und Detergentien (Bass et al. 1977, Smith und Piper 1972, Mitrovic et al. 1968, Schweiger 1956, McKeown und March 1978) zu vollkommener Zerstörung der Kiemen und damit auch zur Erstickung der Fische. Diesen Vergiftungen ist die beschriebene Reaktion der Epithelien nach Aretit®-Einwirkung bis zur Ausbildung der Aneurismen ähnlich. Die große Gewebsabschnitte erfassenden massiven histopathologischen Veränderungen, wie sie auch bei den oben angeführten Substanzen auftreten, gibt es bei einer Aretit®-Behandlung nicht. Hier setzt schon zwischen 24 - 48 h Einwirkung die Regeneration des Kiemengewebes ein. Die Veränderungen können somit als eine generelle inflammatorische Reaktion auf eine Reizung des Gewebes durch den Giftstoff erklärt werden, der an die Oberfläche gelangt bzw. von ihr aufgenommen wird.
Besondere Aufmerksamkeit verdient in diesem Zusammenhang die Ablösung des respiratorischen Epithels, die wiederum

nach Vergiftung mit ganz verschiedenen Substanzklassen auftritt (Skidmore und Tovell 1972). Sie wird einerseits als unspezifische Schutzmaßnahme zur Vergrößerung der Wasser-Blutschranke (Morgan und Tovell 1973), andererseits als Reorganisation der Epithelien (Abel und Skdimore 1975) gedeutet. Christie und Battle (1963) geben als Ursache eine Ausdehnung des "lymphatischen" Raumes an. Die vorliegenden elektronenmikroskopischen Bilder sprechen für die letzte Hypothese. Sie geben ferner einen Hinweis, daß es neben Störungen in der Atmungsfunktion auch noch zu Einschränkungen im Ionenaustausch kommt (vermehrtes Auftreten von Chloridzellen; Hughes und Wright 1970).
Die histologischen Untersuchungen am Kiemengewebe machen klar, daß nach akuter Vergiftung die toxischen Auswirkungen im Organismus bereits ein solches Ausmaß erreichen, daß umfangreiche Gewebsreaktionen in den Kiemen zeitlich nicht mehr möglich sind. Die beschriebenen Gewebsschädigungen treten somit vor allem im subletalen Bereich bei chronischer Vergiftung auf.

Die relativ rasch ablaufende akute Vergiftung läßt sich durch die Wirkungsweise zahlreicher aromatischer Nitroverbindungen erklären. Es ist bekannt, daß sie in den Energiestoffwechsel, insbesondere in den Kohlehydratstoffwechsel der Zellen eingreifen, hier die ATP-Bildung hemmen, die oxidative Phosphorylierung blockieren und den Ruhestoffwechsel insgesamt steigern (10 - 12 fach). Es folgt eine aerobe Glykolyse mit nachfolgender Glykogenverarmung in der Leber und in der Muskulatur. Auch direkte Angriffspunkte im ZNS werden vermutet (Hassall 1982, Klimmer 1971, Schenker et al. 1967, Wirth und Gloxhuber 1981).

Über den Wirkungsmechanismus der herbiziden Dinitrophenole bzw. Dinosebacetat liegen zahlreiche Untersuchungen an pflanzlichen Organismen vor die zeigen, daß der Intoxikation auch hier der gleiche Mechanismus - die Hemmung der ATP-Bildung (bis zu 90 %; Ashton und Crafts 1973) -

zugrunde liegt. Die Dinitrophenole wirken auch im pflanzlichen Zellstoffwechsel als Entkoppler, indem sie die Oxidation von der Phosphorylation im Elektronentransportsystem der Mitochondrien trennen (Hassall 1982, Moreland 1980, Belbachir et al. 1980a, 1980b, Paeschke und Heitefuss 1978). Eine Hemmung der ATP-Produktion von tierischen Zellen konnte bereits für Pentachlorphenol an isolierten Mitochondrien (Schnecke, Ratte) nachgewiesen werden (Weinbach 1956, Weinbach und Garbus 1965, Garbus und Weinbach 1963). Bei Intoxikation mit diesem Biozid waren auch die Aktivitäten einzelner Enzyme aus dem Zitronensäurezyklus und der Atmungskette gesteigert (Boström 1972).
Bei Fischen liegen entsprechende Untersuchungen bislang nicht vor. Gerade bei ihnen bietet sich aber ein besonders einfacher experimenteller Zugang über die folgenden Blutparameter: ATP-Gehalt des Blutes, Hämoglobin im Serum, osmotische Resistenz der Erythrozyten, Lactat-Gehalt im Blut und Methämoglobinkonzentration. Alle Parameter stehen direkt oder indirekt mit der ATP-Bildung in den Erythrozyten im Zusammenhang. Die Erythrozyten der Fische, die Zellkerne und Mitochondrien enthalten, betreiben einen aeroben Stoffwechsel mit einer ATP-Gewinnung über die oxidative Phosphorylierung (Greaney und Powers 1978). Die hemmende Wirkung eines "Entkopplers" muß sich deshalb bei allen davon abhängigen Blutparametern zeigen.

In Tab. 8 sind alle signifikanten Veränderungen dieser Parameter nach akuter und subakuter Intoxikation mit Aretit® (1 - 48 h, 0,07 und 0,2 ppm) zusammengefaßt. Bei akuter Intoxikation ist der ATP-Gehalt im Blut zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant erniedrigt. Sowohl bei 0,2 als auch bei 0,5 ppm Aretit® sinkt er von 60 mg auf durchschnittlich 11 mg/100 ml Blut, also um etwa 80 %. Bei subakuter Vergiftung ist die Erniedrigung mit 30 % bereits nach 4 h am Tiefpunkt. Obwohl nach 10 und 24 h ein langsamer Anstieg erfolgt, ist der Unterschied gegenüber den Kontrollen noch immer signifikant. Erst nach 48 h ist der

Ausgangswert wieder erreicht, die Wiedererholung gelingt. Die 80 %ige Verringerung des ATP-Gehaltes übertrifft die bekannten Fälle einer Cyanidvergiftung bei Fundulus heteroclitus (Greaney und Powers 1978) noch um das Doppelte. Fische erniedrigen außerdem aktiv ihren ATP-Gehalt im Blut unter akutem O_2-Mangel (Wood und Johansen 1972). In diesem Fall (bei erstickten Tieren) liegt die Erniedrigung jedoch bei 10 % gegenüber den Kontrollfischen (Smit und Hattingh 1981). Demnach liegt bei der Intoxikation mit Aretit® ein extremer Eingriff in die ATP-Bildung vor.

Die allgemeinen Reaktionen der Fische deuten ebenfalls auf diese Vergiftungssymptome hin: Die Mobilisierung der kreisenden Blutmenge, das Auftauchen kleinerer Erythrozyten (Proerythrozyten) mit geringerem Hämoglobingehalt sowie die Erhöhung der Atemfrequenz und der Atemtiefe. Alle diese Faktoren deuten, in diesem Zusammenhang gesehen, eine kompensatorische Stoffwechselsteigerung an. Ganz ähnliche Auswirkungen zeigen Salmoniden bei Vergiftung mit Ammonium, das möglicherweise ebenfalls als "Entkoppler" wirkt (Sousa und Meade 1977, Smart 1978, Swift 1981). Der in allen Fällen erkennbare "Sauerstoffmangel" beruht dabei primär auf dem gesteigerten Bedarf im Zellstoffwechsel, einer Hypoxie nach dem I-Typus (Hughes 1973). Im Falle der Ammonium-Vergiftung erfolgt die tödliche Schädigung vermutlich im Bereich des cerebralen Energiestoffwechsels nach der Entleerung der ATP- bzw. Kreatinphosphatspeicher (Karlson 1974, Schenker et al. 1977, Visek 1968). Der rasche Ablauf der Intoxikation mit Dinitrophenolen deutet in die gleiche Richtung.

Das biologische Vergiftungsbild ergänzt diese Befunde noch, vor allem die bei den Regenbogenforellen beobachtete Körperstarre, die noch vor dem Tod der Tiere eintritt. Sie läßt sich mit einem rapiden Absinken des ATP-Gehaltes in der Skelettmuskulatur begründen. Auch bei Hunden und Ratten kommt es nach Einwirkung von 3,5-Dinitro-Ortho-Cresol bzw. Dinosebacetat bereits vor dem Tod zu muskulärer ATP-Verarmung (Industrieverband Pflanzenschutz e.V. 1982, Parker 1951).

Tab. 8: Signifikanzprüfung von Blutparametern auf Unterschiedlichkeit gegenüber Kontrollwerten bei unterschiedlich langer Einwirkungszeit (+ = signifikant verändert, - = nicht signifikant verändert).

a) 0,2 ppm Aretit®.
b) 0,07 ppm Aretit®.

a) Blutparameter	1 h	2 h	3 h	3,5 h[1]
Methämoglobin	+	+	+	
Hämoglobin (Serum)	-	+	+	
ATP-Gehalt (0,2 ppm)	+	+	+	+
ATP-Gehalt (0,5 ppm)[2]	+	+		

b) Blutparameter	4 h	10 h	24 h	48 h
Methämoglobin	+	+	+	-
Hämoglobin (Serum)	+	+	+	+
Osmotische Resistenz				
minimal	+	+	+	-
maximal	+	+	+	-
Lactat-Gehalt	+	+	-	-
ATP-Gehalt	+	+	+	-

[1] wurde nur bei der Bestimmung des ATP-Gehaltes untersucht.
[2] Der ATP-Gehalt wurde auch bei 0,5 ppm untersucht.

In der vorliegenden Untersuchung fällt die große Widerstandsfähigkeit der Karpfen gegenüber dem Herbizid auf. Sie läßt sich mit der hohen Toleranz gegenüber niedrigen O_2-Spannungen erklären (Blazka 1958, Lykkeboe und Weber 1978). Bei Störung des aeroben Zellstoffwechsels können Karpfen ihren Energiebedarf relativ lange über anerobe Prozesse decken, da bei ihnen zwei alternative Wege der Glykolyse existieren (Hochachka 1975, Hochachka et al. 1973, Johnston 1977).

Die Hemmung der ATP-Bildung zeigt sich indirekt bei allen ATP-abhängigen Prozessen in den Blutzellen sowie an ihren Membranen. Dies gilt für die Erhaltung der Zellvolumina, der Zellform und der osmotischen Verhältnisse. Eine Störung in diesem Bereich führt zu toxisch hämolytischen Anämien

und zur Verminderung der osmotischen Resistenz. Die hämolytische Wirkung von Phenol, Nitrobenzol ud Kresol ist auch beim Warmblüterorganismus bekannt (Begemann 1977). Bei akuter Vergiftung der Forellen mit Aretit® ist die Konzentration an Methämoglobin zu allen Versuchszeiten signifikant erhöht. Nach 3 h Einwirkungsdauer steigt der Gehalt an Methämoglobin auf das 10 fache der Kontrollen an, bei denen etwa 1 % der gesamten Hämoglobinmenge in Form von Methämoglobin vorliegt. Da Fische gegenüber Methämoglobinämien viel toleranter sind als Warmblüter (Brown und McLeay 1978, Cameron 1971, Huey et al. 1980, Smith 1975, Smith und Williams 1974) ist bei den vorliegenden Konzentrationen noch nicht mit tödlichen Vergiftungen zu rechnen, zumal die Fische nach etwa 48 h subakuter Behandlung ihre Ausgangswerte wieder erreichen.

Wesentlich kritischer sind die Anzeichen eines raschen Zerfalls von Blutzellen und das Ansteigen des freien Hämoglobins im Serum zu beurteilen. Bei akuter und subakuter Intoxikation stellen sich signifikante Erhöhungen der Hämoglobinkonzentration im Serum ein, die eine gesteigerte Hämolyse anzeigen (Tab. 8). Diese steht im Zusammenhang mit der berits bei subakuter Vergiftung nachgewiesenen Verminderung der osmotischen Resistenz der Erythrozyten, deren Membranfunktionen durch den ATP-Mangel gestört sind. Es kommt zu toxisch bedingter hämolytischer Anämie, wie sie bei Warmblütlern bei Phenolvergiftungen auftreten. Da bei Fischen auch andere Substanzen aus verschiedenen Stoffklassen hämolytisch wirken (Brozio und Litzbarski 1977, Kodama et al. 1982, Zeitoun 1977) sind die auftretenden Symptome jedoch nicht giftspezifisch.

Die Tatsache, daß der Lactatgehalt des Blutes bei subakuter Vergiftung nur relativ gering erhöht ist, läßt darauf schließen, daß nach der Hemmung der ATP-Bildung über die oxidative Phosphorylierung auch keine kompensatorischen Maßnahmen über den anaeroben Stoffwechsel eingeschlagen werden.

Insgesamt haben die Versuche gezeigt, daß die akute Aretit®-Vergiftung innerhalb weniger Stunden abläuft und zum Tode führt; zu Beginn der Einwirkung liegt eine sehr hohe Toxizität vor. Bei subletaler Konzentration kommt es dagegen schon innerhalb von 48 h zu einer erstaunlichen Wiedererholung, eine Tatsache die auch im Warmblüterorganismus bei Anwendung ähnlicher Pestizidformulierungen beobachtet wurde (Parker 1951). Wie im Säugetier gibt es auch bei den Fischen keine akkummulierende Giftwirkung. Dies geht aus einem Versuch hervor, in dem 5 Forellen über 20 Tage hinweg jeweils nach 24 h in eine neu hergestellte Aretit®-Lösung umgesetzt wurden. Alle Fische überlebten diesen Versuch. Die Toleranzgrenze wird somit auch bei mehrfacher Applikation des Giftstoffes nicht überschritten. Die Speicherung des Giftstoffes sowie die metabolische Inaktivierung und Ausscheidung dürften hierbei eine herausragende Rolle spielen, wobei der letztgenannte Prozess gerade bei phenolischen Herbiziden sehr lange nachgewiesen werden kann (bei Ratten noch nach 50 Tagen; Paulson 1975, Ernst 1967).

Wenngleich die Frage nach der Primärwirkung des Herbizides noch nicht als hinreichend beantwortet gelten kann, ist nach den vorliegenden Untersuchungen die Beeinflussung zentraler Prozesse im Energiestoffwechsel gesichert. Ob diese massive Störung unmittelbar zum Tode führt, oder aber erst mittelbar durch den Wirkstoff induzierte Schädigungen biochemischer, physiologischer oder morhpologischer Natur letal wirken, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gesagt werden.

VI. Zusammenfassung

In verschiedenen Organen und Geweben der Regenbogenforelle (Salmo gairdneri) wurden die Manifestationen einer letalen (0,2 ppm) und subletalen (0,07 ppm) Aretit®-Behandlung untersucht. Als Blutparameter dienten Hämoglobin, Hämatokrit, Glucose, Methämoglobin, Hämoglobin im Serum und ATP-Gehalt. Im subletalen Bereich wurde zusätzlich die osmotische Resistenz der Erythrozyten und der Lactat-Gehalt im Blut ermittelt. Ferner wurde das Lebergewebe (lichtmikroskopisch) und das Kiemengewebe (licht- und elektronenmikroskopisch) untersucht.

1. Im Blut der behandelten Fische waren bei akut-toxischer Aretit®-Einwirkung (0,2 ppm) schon nach 1 h der Hämoglobingehalt, der Hämatokrit und die Methämoglobinkonzentration erhöht, der ATP-Gehalt dagegen erniedrigt. Nach 2 und 3 h waren alle untersuchten Blutparameter signifikant von den Kontrollwerten verschieden. Der Hämoglobingehalt war nach 3-stündiger Einwirkungszeit um durchschnittlich 40 %, der Hämatokrit um 35 %, die Erythrozytenzahl sogar um 65 % erhöht. Der ATP-Gehalt sank dagegen auf 45 % des Ausgangswertes. Die größten Veränderungen ergaben sich beim Methämoglobingehalt (13-fach erhöht) und beim Hämoglobingehalt im Serum (10,5 fach erhöht). Eine subakute Aretit®-Konzentration (0,07 ppm) ergab ebenfalls der Einwirkungszeit entsprechende Veränderungen im Blutbild. Mit Ausnahme der Erythrozytenzahl (nach 4 h) und der Glucosekonzentration (nach 10 h) waren zu beiden Zeitpunkten alle untersuchten Blutparameter signifikant verändert. Nach 24 h unterschieden sich jedoch Hämoglobingehalt, Hämatokrit, Erythrozytenzahl, Glucose- und Lactat-Gehalt nicht mehr von den Ausgangswerten. Bei Versuchsende (48 h) zeigte nur noch der Hämoglobin-

anteil im Serum einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollen. Daraus läßt sich schließen, daß eine weitgehende Wiedererholung im Fischorganismus erfolgt ist.

2. Die histologische Untersuchung des Lebergewebes zeigte, daß letale wie auch subletale Konzentrationen von Aretit® den Grad der Blutfüllung beeinflussen. Bei akuter Intoxikation waren die Lebersinusoide und die Gefäße bereits nach 1 h Einwirkungszeit nur noch partiell mit Blut gefüllt. Dieses Ergebnis wurde nach 2 und 3 h noch deutlicher. Eine subletale Behandlung hatte - ähnlich den untersuchten Blutparametern - nur einen temporären Effekt. Erst nach 24 und 48 h Einwirkung zeigten sich nachhaltige Veränderungen in Form einer Hypertrophie und Vakuolisation des Parenchyms sowie vereinzelt erscheinender pyknotischer Kerne, Zellnekrosen und Entmischungen des Zytoplasmas.

3. Das Kiemengewebe reagierte auf eine letale Aretit®-Intoxikation uneinheitlich. Vereinzelt trat Hypertrophie im Epithel der Sekundärlamellen auf. Nach 2 h Pestizideinwirkung entstanden erste flüssigkeitsgefüllte Hohlräume. Daneben fanden sich Zellnekrosen und verstärkte Schleimabsonderungen. Die subakute Einwirkung führte wieder, der Einwirkungszeit entsprechend, zu Gewebsreaktionen. Die nach 4 h beobachteten Läsionen entsprachen weitgehend den nach 1 - 2 h bei akuter Intoxikation ermittelten Gewebsveränderungen. Darüber hinaus kam es zu Hyperämien im zentralen Venensinus. Nach 10 h zeigten sich erste Hämatome und Faltungen der Sekundärlamellen sowie Hypertrophien und Hyperplasien im Bereich des gesamten Kiemenepithels. Die Epithelien waren teilweise abgelöst und einzelne Pfeilerzellen degeneriert. Nach 48 h und 72 h Behandlungsdauer waren diese Symptome wieder weitgehend verschwunden. Die nach 24-stündiger Aretit®-Ein-

wirkung (lichtmikroskopisch) festgestellten Gewebeschäden konnten auch durch elektronenmikroskopische Untersuchung spezifiziert werden. Die zahlreichen Hypertrophien stellten sich als Vergrößerung der Interzellularräume und als "lymphatische" Ektasien, die Hyperplasien als Vermehrung der Epithelzellen mit undifferenzierten, plasmaärmeren Zellen dar. Die verstärkte Acidophilie im lichmikroskopischen Präparat ließ sich auf eine Vermehrung der Chloridzellen zurückführen. Die Fortsätze der Pfeilerzellen und die darüberliegende Basalmembran waren auch im elektronenmikroskopischen Bild stark verfaltet.

VII. Literatur

Abel, P.D. und Skidmore, F. (1975): Toxic effects of an anionic detergent on the gills of rainbow trout. Water Res. 9, 759 - 765.

Albrecht, M.L. (1977): Die Bedeutung von Streßfolgen für den Fischorganismus. Zeitschr. für die Binnenfischerei der DDR 24, 247 - 250.

Ashton, F.M. und Crafts, A.S. (1973): Mode of action of herbicides. New York.

Bass, M.L., Berry, C.R., Heath, A.G. and R. (1977): Histopathological effects of intermittent chlorine exposure on bluegill (Lepomis macrochirus) and rainbow trout (Salmo gairdneri). Water Res. 11, 731 - 735.

Begemann, H. (1977): Praktische Hämatologie. Stuttgart.

Belbachir, O., Matringe, M., Tissut, M., Chevallier D. (1980a): Physiological actions of dinoterb, a phenol derivative. 1. Physiological effects on the whole plant and on tissue fragments of Pea. Pesticide Biochem. and Physiol. 14, 303 - 308.

Belbachir, O., Matringe, M., Chevallier, D., Tissut, M. (1980b): Physiological actions of dinoterb, a phenol derivative. 2. Effects on isolated plant mitochondria and chloroplasts. Pesticide Biochem. and Physiol. 14, 309 - 313.

Beyer, W.H. (ed.) (1968): Handbook for probability and statistics. Cleveland.

Black, E.C. (1955): Blood levels of hemoglobin and lactic acid in some freshwater fishes following exercise. J. Fish. Res. Bd. Canada 12, 917 - 929.

Black, E.C., Bosomworth, N.J., Docherty, G.E. (1966): Combined effect of starvation and severe exercise on glycogen metabolism of rainbow trout, Salmo gairdneri. J. Fish. Res. Bd. Canada 23, 1461 - 1463.

Blazka, P. (1958): The anaerobic metabolism of fish. Physiol. Zool. 31, 117 - 128.

Boström, S.L. und Johansson, R.G. (1977): Effects of pentachlorophenol on enzymes involved in energy metabolism in the liver of the eel. Comp. Biochem. Physiol. 41B, 359 - 369.

Brown, D.A. und McLeay (1978): Effect of nitrite on methemoglobin and total hemoglobin of juvenile rainbow trout. The progr. fish-culturist 37, 36 - 38.

Brown, M.V., Mitrovic, V.V., Stark, G.T.C. (1968): Effects of chronic exposure to zinc toxicity of a mixture of detergent and zinc. Water Res. 2, 255 - 263.

Brozio, F. und Litzbarski, H. (1977): Untersuchungen über physiologische und histologische Veränderungen am Karpfen nach Toxapheneinwirkung - Teil I. Zeitschr. für die Binnenfischerei der DDR 24, 118 - 126.

Buikema, A.L., McGinnis, M.J., Cairns, J. (1979): Phenolics in aquatic ecosystems: A selected review of recent literature. Marine Environ. Res. 2, 87 - 181.

Cameron, J.N. (1971): Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. 40A, 743 - 749.

Casillas, E. und Smith, L.S. (1977): Effects of stress on blood coagulation and hematology in rainbow trout (Salmo gairdneri). J. Fish Biol. 10, 481 - 491.

Chavin, W. und Young, J.E. (1970): Factors in the determination of normal serum glucose levels of goldfish, Carassius auratus L.. Comp. Biochem. Physiol. 33, 629 - 653.

Christie, R.M. und Battle, H.I. (1963): Histological effects of 3-trifluormethyl-4-nitrophenol (TFM) on larval lamprey and trout. Can. J. Zool. 41, 51 - 61.

Cope, O.B. (1965): Some responses of freshwater fish to herbicides. Proc. S. Weed Conf. 18, 434 - 445.

Couch, J.A. (1975): Histopathological effects of pesticides and related chemicals in the livers of fishes. In: The pathology of fishes. Proccedings of a symposium. (W.E. Ribelin and G. Migaki, eds.). Madison.

Dixon, D.G. und Leduc, G. (1981): Chronic cyanide poisoning of rainbow trout and its effect on growth, respiration and liver histopathology. Arch. Environm. Cont. Tox. 10, 117 - 131.

Doudoroff, P., Anderson, B.G., Burdick, G.E., Galtsoff, P.S., Hart, W.B., Patrick, P., Strong, E.R., Surber, E.W., Van Horn, W.M. (1951): Bioassay methods for the evaluation of acute toxicity of industrial wastes to fish. Sewage ind. Wastes 23, 1380 - 1397.

Eller, L.L. (1971): Histopathological lesions in cutthroat trout (Salmo clarki) exposed chronically to the insecticide Endrin. Am. J. of Path. 64, 321 - 336.

Ernst, W. (1967): Der Stoffwechsel von Pesticiden in Säugetieren. c) Dinitroverbindungen (DNP, DNOC, Dinoseb, 2,4-Dinitro-6-sec,-butylphenylacetat und Binapacryl). Residue Rev. 18, 144 - 146.

Evelyn, K.A. und Malloy, H.T. (1983): Microdetermination of oxyhemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. J. of Biol. Chem. 126, 656 - 662.

Garbus, J. und Weinbach, E.C. (1963): Restoration of oxidative phosphorylation and related reactions in uncoupled mitochondria by albumin. Fedn. Proc. Fedn. Am. Soc. exp. Biol. 22, 405.

Greaney, G.S. und Powers, D.A. (1978): Allosteric modifiers of fish hemoglobins: in vitro and in vivo studies of the effect of ambient oxygen and ph on erythrocyte ATP concentrations. J. exp. Zool. 203, 339 - 350.

Hassall, K.A. (1982): The chemistry of pesticides. Weinheim, Deerfield Beach, Basel.

Hendricks, J.L. (1952): Erythrocyte counts and haemoglobin determination for two species of suckers, genus Calostomus from Colorado, Copeia 4, 255 - 256.

Hendricks, J.D., Sinnhuber, R.O., Henderson, M.C., Buhler, D.R. (1981): Liver and kidney pathology in rainbow trout (Salmo gairdneri) exposed to dietary pyrrolizidine (Senecio) alkaloids. Exp. and molecular pathology 35, 170 - 183.

Hesser, E.F. (1960): Methods for routine fish hematology. The progr. fish-culturist 22, 164 - 171.

Hille, S. (1982): A literature review of the blood chemistry of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. J. Fish Biol. 20, 535 - 569.

Hille, S. und von Pöllnitz, C. (1980): Methodik hämatologischer und biochemischer Untersuchungen an der Regenbogenforelle. Tierärztl. Prax. 521 - 534.

Hochachka, P.W. (1975): An exploration of metabolic and enzyme mechanisms underlying animal life without oxygen. In: Biochemical and biophysical perspectives in marine biology (D.C. Malins und J.R. Sargent, eds.) London.

Hochachka, P.W., Fields, J., Mustafa, T. (1973): Animal life without oxygen: basic biochemical mechanisms. Am. Zool. 13, 543 - 555.

Holmberg, B., Jensen, S., Lársson, A. (1972): Metabolic effects of technical pentachlorophenol (pcp) on the eel Anguilla anguilla. Comp. Biochem. Physiol. 43B, 171 - 183.

Huey, D.W., Simco, B.A., Criswell, D.W. (1980): Nitrite-induced methemoglobin formation in channel catfish. Trans. Am. Fish. Soc. 109, 558 - 562.

Hughes, G.M. (1973): Respiratory responses to hypoxia in fish. Am. Zool. 13, 475 - 489.

Hughes, G.M. und Wright, D.E. (1970): A comparative study of the ultrastructure of the water blood pathway in the secondary lamellae of teleost and elasmobranch fishes - benthic forms. Z. Zellforsch. 104, 478 - 493.

Industrieverband Pflanzenschutz e.V. (1982): Wirkstoffe in Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln. Frankfurt.

Jauch, D. (1979). Gill lesions in cichlid fishes after intoxication with the insecticide Fenthion. Experientia 35, 371 - 372.

Johnston, J.A. (1977): A comparative study of glycolysis in red and white muscles of the trout (Salmo gairdneri) and mirror carp (Cyprinus carpio). J. Fish Biol. 11, 575 - 588.

Jülich, F. (1981): Hämatologische Untersuchungen an Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) und Karpfen (Cyprinus carpio) nach Einwirkung von subletalen Konzentrationen der Pflanzenschutzmittel Rogor, Benomyl, Pomuran und Domatol-Spezial. Dissertation Tübingen.

Kaboth, W. und Begemann, H. (1977): Physiologie des Menschen. Bd. 5 Blut. München, Wien, Baltimore.

Karlson, P. (1974): Biochemie. Stuttgart.

Klimmer, O. (1971): Pflanzenschutz und Schädlingsbekämpfungsmittel. Abriß einer Toxikologie und Therapie von Vergiftungen. Bonn.

Kodama, M., Ogata, T., Yamamori, K. (1982): Hemolysis of erythrocytes of rainbow trout Salmo g. exposed to zinc polluted water. Bull. of the Jap. Soc. of Scien. Fish. 48, 593.

Körting, N. (1968): Untersuchungen zur Einwirkung des Ammoniaks auf das Blut der Fische. Dissertation München.

Kristofferson, R., Broberg, S., Oikari, A. (1973): Physiological effects of a sublethal concentration of phenol in the pike (Esox lucius L.) in pure brakkish water. Ann. Zool. Fenici 10, 392 - 397.

Kuhn, O. und Koecke, H.U. (1956): Histologische und cytologische Veränderungen der Fischkieme nach Einwirkung im Wasser enthaltener schädigender Substanzen. Z. Zellforsch. 43, 611 - 643.

Laurent, P. und Dunel, S. (1976): Functional organization of the teleost gill. I. Blood pathways. Acta zool. 57, 189 - 209.

Leung, T.S., Naqvi, S.M., Leblanc, C. (1983): Toxicities of two herbicides (basagran, diquat) and an algicide (cutrine-plus) to mosquitofish Gambusia affinis. Environ. Poll. Ser. A 30, 153 - 160.

Lykkeboe, G. und Weber, R.E. (1978): Changes in the respiratory properties of the blood in the carp, Cyprinus carpio, induced by diurnal variation in ambient oxygen tension. J. Comp. Phys. 128B, 117 - 125.

Mathur, D.S. (1962): Studies on the histopathological changes induced by DDT in the liver, kidney and intestine of certain fishes. Experientia, 18, 506 - 509.

Mc Craren, J.P., Cope, O.B., Eller, L.L. (1969): Some chronic effects of diuron on bluegills. Weed Sci. 17, 497 - 504.

McKeown, B.A. und March, G.L. (1977): The acute effect of bunker C oil and oil dispersant on: 1. serum glucose, serum sodium and gill morphology in both freshwater and seawater acclimated rainbow trout (Salmo gairdneri). Water Res. 12, 157 - 163.

McKim J.M., Christensen, G.M., Hunt, E.P. (1970): Changes in the blood of brook trout (Salvelinus fontinalis) after short-term and long-term exposure to copper. J. Fish. Res. Bd. Canada 27, 1883 - 1889.

Miller, W.R., Hendricks, A.C., Cairns, J. (1983): Normal ranges for diagnostically important hematological and blood chemistry characteristics of rainbow trout (S. gairdneri). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40, 420 - 425.

Mitrovic, V.V., Brown , V.M., Shurben, D.G., Berryman, M.H. (1968): Some pathological effects of sub-acute and acute poisoning of rainbow trout by phenol in hard water. Water Res. 2, 249 - 254.

Moreland, D.E. (1980): Mechanisms of action of herbicides. Ann. Rev. Plant Physiol. 31, 597 - 638.

Morgan, M. und Tovell, P.W.A. (1973): The structure of the gill of the trout, Salmo gairdneri (Richardson). Z. Zellforsch. 142, 147 - 162.

Neville, C.M. (1979): Sublethal effects of environmental acidification on rainbow trout (Salmo gairdneri). J. Fish. Res. Bd. Canada 36, 84 - 87.

Nigrelli, R.F. und Jakowska, S. (1961): Fatty degeneration, regenerative hyperplasia and neoplasie in the livers of rainbow trout, Salmo gairdneri. Zoologica 46, 49 - 55.

Owen, J.W. und Rosso, S. W. (1981): Effects of sublethal concentrations of pentachlorophenol on the liver of bluegill sunfish, Lepomis macrochirus. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 26, 594 - 600.

Paeschke, R.R. und Heitefuss, R. (1978): Der Einfluß von Herbiziden auf metabolisch aktive Bakterien und Pilze im Boden bei erstmaliger und mehrjähriger Anwendung. Zeitschr. für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 85, 471 - 481.

Parker, V.H., Barnes, J.M., Denz, F.A. (1951): Some observations on the toxic properties of 3:5 dinitro-ortho-cresol. Brit. J. industr. Med. 8, 226 - 235.

Paulson, G.D. (1975): Fates of herbicides in animals. Residue Rev. 58, 1 - 111.

Reed, A.H., Henry, R.J., Mason, W.B. (1971): Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. Clin. Chemistry 17, 275 - 284.

Sachs, L. (1979): Angewandte Statistik. Berlin, Heidelberg, New York.

Scheffé, H. (1953): A method for judging all contrasts in the analysis of variance. Biometrika 40, 87 - 140.

Schenker, S., McCandless, D.W., Brophy, E., Lewis, M.S. (1967): Studies on the intracerebral toxicity of ammonia. J. of Clinical investigation 46, 838 - 848.

Schiffman, R.H. und Fromm, P.O. (1959): Chromium-induced changes in the blood of rainbow trout, Salmo gairdneri. Sewage and industrial wastes 31, 205 - 211.

Schulz, D. (1970): Studien über Nebenwirkungen des Herbizids NaTA (Na-Trichloracetat) auf Karpfen. Zentralbl. für Veterinärmedizin, Reihe A 17, 230 - 251.

- - - - - (1971): Durch das Herbizid Dowpon bedingte, lichtmikroskopische, biochemische und elektronenmikroskopische Veränderungen am exokrinen Pankreas des Karpfen. Zeitschr. für angew. Zoologie 58, 63 - 79.

Schweiger, G. (1956): Die toxikologische Einwirkung von Schwermetallsalzen auf Fische und Fischnährtiere. Dissertation München.

Silbergeld, E.K. (1974): Blood glucose: A sensitive indicator of environmental stress in fish. Bull. Environ. Cont. and Tox. 11, 20 - 25.

Skidmore, J.F. und Tovell, P.W.A. (1972): Toxic effects of zinc sulphate on the gills of rainbow trout. Water Res. 6, 217 - 230.

Smart, G. (1976): The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (Salmo gairdneri). J. Fish Biol. 8, 471 - 475.

Smart, G. (1978): Investigations of the toxic mechanisms of ammonia to fish - gas exchange in rainbow trout (salmo gairdneri) exposed to acutely lethal concentrations. J. Fish Biol. 12, 93 - 104.

Smit, G.L. und Hattingh, J. (1981): The effect of hypoxia on haemoglobins and ATP levels in three freshwater fish species. Comp. Biochem. Physiol. 68A, 519 - 521.

Smith, C.E. (1975): Nitrite-induced methemoglobinemia in rainbow trout. The progr. fish-culturist 37, 150 - 152.

Smith, C.E. und Piper, R.G. (1972): Pathological effects in formalin-treated rainbow trout (Salmo gairdneri). J. Fish. Res. Bd. Canada 29, 328 - 329.

Smith, C.E. und Piper, R.G. (1975): Lesions associated with chronic exposure to ammonia. In: The pathology of fishes. Proceedings of a symposium (W.E. Ribelin und G. Migaki, eds.). Madison.

Smith, C.E., Williams, W.G. (1974): Experimental nitrite toxicity in rainbow trout and chinook salmon. Trans. Am. Fish. Soc. 103, 389 - 390.

Sniezko, S.F. (1960): Microhematocrit as a tool in fishery research and management. Spe. Scient. Rep. Fish Nr. 341.

Sousa, R.J. und Meade, T.L. (1977): The influence of ammonia on the oxygen delivery system of coho salmon hemoglobin. Comp. Biochem. Physiol. 58A, 23 - 28.

Sprague, J.B. (1969): Measurement of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res. 3, 793 - 831.

Swift, D.J. (1981): Changes in selected blood component concentrations of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, exposed to hypoxia or sublethal concentrations of phenol or ammonia. J. Fish Biol. 19. 45 - 61.

Tandon, R.S. und Joshi, B.D. (1973): Blood glucose and lactic acid levels in the fresh water fish, Heteropneustes fossilis, following stress. Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelkunde 31, 210 - 216.

Temmink, J.H.M., Bouwmeister, P.J., De Jong, P., Van den Berg, J.H.J. (1983): An ultrastructural study of chromate induced hyperplasia in the gill of rainbow trout (Salmo gairdneri). Aquatic Toxicology 4, 165 - 179.

Tuurala, H. und Soivio, A. (1982): Structural and circulatory changes in the secondary lamellae of Salmo gairdneri gills after sublethal exposure to dehydroabietic acid and zinc. Aquatic Toxicology 4, 165 - 179.

Van der Putte, I. und Pärt, P. (1982): Oxygen and chromium transfer in perfused gills of rainbow trout (Salmo gairdneri) exposed to hexovalent chromium at two different ph levels. Aquatic Toxilogy 2, 31 - 45.

Visek, W.J. (1968): Some aspects of ammonia toxicity in animal cells. J. Dairy Sci. 51, 286 - 295.

Waluga, D. (1966): Phenol effects on the anatomico-histopathological changes in bream (Abramis brama L.). Acta hydrobiologica 8, 55 - 78.

Watson, T.A. und McKeown, B.A. (1976): The effect of sublethal concentrations of zinc on growth and plasma glucose levels in rainbow trout, Salmo gairdneri (Richardson). Journal of Wildlife Diseases 12, 263 - 271.

Weber, E. (1972): Grundriß der biologischen Statistik. Stuttgart.

Weinbach, E.C. (1956): The influence of pentachlorophenol on oxidative and glycolytic phosphorylation in snail tissue. Archs. Biochem. Biophys 64, 129 - 143.

Weinbach, E.C. und Garbus, J. (1965): The interaction of uncoupling phenols with mitochondria and mitochondrial protein. J. biol. Chem. 240, 1811 - 1819.

Wood, S.C. und Johansen, K. (1972): Adaptation to hypoxia by increased HbO_2 affinity and decreased red cell ATP concentration. Nature New Biology 237, 278 - 279.

Zeitoun, J.H. (1977): The effect of chlorine toxicity on certain blood parameters of adult rainbow trout (Salmo gairdneri). Env. Biol. Fish. 1, 189 - 195.

Teil III

Auswirkungen von Aretit® auf verschiedene Entwicklungsstadien von Rana temporaria

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Summary	1
II.	Einleitung	3
III.	Material und Methoden	5
IV.	Ergebnisse	8
	A. Versuche mit 1-stündiger Behandlungsdauer	8
	1. LC_{50}-Wert, letaler Konzentrationsbereich und Bereich der Grenzkonzentration der verschiedenen Entwicklungsstadien	8
	2. Auswirkungen auf die Schlüpftermine	11
	3. Tauchversuche bei Embryonen mit und ohne Ei- und Gallerthülle	17
	B. Versuche mit 24-stündiger Behandlungsdauer	19
	1. LC_{50}-Wert, letaler Konzentrationsbereich und Bereich der Grenzkonzentration der verschiedenen Entwicklungsstadien	19
	2. Auswirkungen auf die Schlüpftermine	22
	C. Mißbildungen nach 1- bzw. 24-stündiger Behandlung	27
	1. Behandlungsstadium Blastula (Versuchsgruppe 2)	27
	2. Behandlungsstadium Gastrula und frühe Neurula (Versuchsgruppe 3, 4)	37

Seite

3. Behandlungsstadium 24 h nach dem Schlüpfen (Versuchsgruppe 9) 40

D. Störungen im Wachstum und in der Metamorphose 44

1. Einfluß auf Längen- und Gewichtszunahme 44

2. Einfluß auf die Metamorphose 47

V. Diskussion 49

VI. Zusammenfassung 58

VII. Literatur 60

I. Summary

In the present study the susceptibility of the key stages in the entire development of the frog Rana temporaria to the herbicide Aretit® was examined. Moreover the toxic effects on hatching, growth and metamorphosis were screened, as well as the malformations, induced by the dinitrophenol-derivate.

1. Within the development of Rana temporaria (freshly laid spawn to late metamorphosis) all the important stages were treated for 1- and 24 h periods with different Aretit®-concentrations. The range of the threshold and the lethal concentration were determined, the LC_{50}-values calculated. In both groups (1 h and 24 h treatment) the toxicity of the pesticide was found to be least in the early stages (until neurulation). It increased in later ontogenetic stages determining the maximum sensitivity after yolk sac resorbation. With a decrease in the toxicity the later larval stages were generally less and nearly constantly susceptible to the herbicide. In this context the protective properties and functions of the jelly coat and egg membrane especially for young embryonic stages could be shown.

2. The start of hatching and the duration of the hatching period was affected by the pesticide. After 1 h and 24 h exposure to the substance in early stages (including tailbud stage), the start of hatching was delayed in relation to the herbicide concentration for up to 8 days. After intoxication of nearly hatched embryos, hatching started earlier and was completed in the extreme case within one day (1 h treatment).

3. Malformations after 1 h and 24 h exposures occured only in a few susceptible developmental stages. The most prominent defects in the embryos were observed after treatment at the blastula stage. The malformations appeared as shortened trunk and tail as well as kinks in the tail, that were located in the dorsoventral and horizontal planes. In higher concentrations, microcephalus, acephalus, cyclopia and duplication of the tail were observed. Microscopic examination showed a bifurcated notochord. Abnormal embryos often had edema of the head, trunk or fin. After intoxication in the gastrula and the early neurula stage the embryos often showed defects caused by an irritated osmoregulation. In the extreme the whole body took the form of a liquid filled sphere. Some of the experimental embryos lacked completely a spinal chord and/or a notochord. Treated animals 1 day after hatching also exhibited edema in head and trunk region. None of the abnormal organisms survived day 20 after hatching. An exposure earlier or later, was either lethal or had no visible effect on the development.

4. Aretit® affected larval growth and metamorphosis of Rana temporaria. After sublethal exposure for 10 days, the tadpoles weight significantly less than the controls. The duration of metamorphosis was positively correlated with the herbicide concentration. In highest concentrations, the organisms either died or did not proceed further development.

II. Einleitung

Kontinuität in einem Ökosystem gibt es nur dann, wenn bei den Mitgliedern der Biozönose Fortpflanzung und Entwicklung gesichert sind. Entwicklungsstadien besitzen naturgemäß eine geringe Mobilität; sie sind ortsgebunden und können Schadstoffen in ihrem Habitat nicht - oder nur sehr schwer - ausweichen. Dies gilt auch für die Jugendstadien der Amphibien, die oftmals in kleinen Tümpeln und Wassergräben leben. Gelangen Umweltgifte in diese Gewässer, so erfolgt die Auswaschung dieser Stoffe sehr langsam. Meist können nur Zerfall und Adsorption die Toxizität noch mindern. Die Wahrscheinlichkeit der Belastung dieser Gewässer mit Pestiziden wird noch dadurch erhöht, daß sie häufig inmitten landwirtschaftlicher Nutzflächen liegen, oder an diese angrenzen.
Die Wahl der Entwicklungsstadien des Grasfrosches für die vorliegende Untersuchung bietet folgende Vorteile: Die Entwicklung der Amphibienkeime ist hervorragend untersucht; sie läßt sich auch unter den einfachen Testbedingungen gut beobachten. Amphibien zeigen bei ihrer Entwicklung bereits das "Programm" der Wirbeltiere.

Die Wirkungsweise von verschiedenen Umweltgiften auf die Entwicklungsstadien von Amphibien wurde von Anderson und Prahlad (1976), Beatty et al. (1976), Chandler (1975), Cooke (1973, 1977, 1979), Dial (1976), Dutta und Mohanty-Hejmadi (1978), Edmisten und Bantle (1982), Hall und Swineford (1980), Johnson (1976), Judd (1977), Marian et al. (1983), Mohanty-Hejmadi und Dutta (1981) untersucht. In den meisten Fällen dienten dazu nur einzelne Entwicklungsstadien. In der vorliegenden Untersuchung sollten die Auswirkungen des Herbizides Aretit® während der gesamten Entwicklungsdauer geprüft werden. Das Kontaktgift (Wirkstoff Dinoseb-Acetat; Menge 492 g/l; chem. Bezeichnung: 2-(1-Methyl-

propyl)-4,6-dinitrophenolacetat) wurde dabei in handelsüblicher Formulierung verwendet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war an den verschiedenen Entwicklungsstadien des Grasfrosches (Rana temporaria) 1.) die Wirkung eines kurzfristigen "Giftstosses" zu prüfen, wie er bei direkter Einbringung des Herbizides in Gewässer entsteht und 2.) eine längerfristige Einwirkung mit niedriger Konzentration zu untersuchen, wie sie indirekt durch allmähliche Auswaschung landwirtschaftlich genutzter Flächen zustande kommt. Als Parameter dazu dienten Veränderungen im Entwicklungsablauf, des Schlüpfvorganges und bei verschiedenen Differenzierungsvorgängen.

III. Material und Methoden

Alle in den Versuchen verwendeten Entwicklungsstadien wurden aus Froschlaich entnommen, der aus Gewässern im Raum Tübingen und Biberach stammte. Durch die Aufzucht unter Laborbedingungen standen alle gewünschten Entwicklungsstadien zur Verfügung. Die frisch befruchteten Eier entstammten von Fröschen, die in Aquarien abgelaicht hatten. Damit war der Zeitpunkt der Befruchtung definiert. Eier, Embryonen und Junglarven wurden in Vollglasbecken (30x22x22,5 cm) bei 10 ± 0,2 °C und LD 12:12 h gehalten. Zur Einleitung der Metamorphose wurde die Temperatur auf 20 °C erhöht und anschließend auf diesem Wert gehalten. Die Larven wurden täglich mit Tetramin-Großflocken (Tetra Werke, D-4520 Melle), Salat und gekochtem Hühnereiweiß gefüttert. Larven in fortgeschrittenem Entwicklungsstadium wurden in großen Eternitbecken (80x50x50 cm) gehalten.

1-stündige Tauchversuche in verschiedenen Konzentrationen von Aretit® wurden in Rundglasschalen mit je 1 l Tübinger Leitungswasser durchgeführt (Wassertemperatur 10,0 ± 0,2 °C, O_2-Gehalt 8,6 ± 0,4 mg/l, ph-Wert 8,2 ± 0,3, Härte 10,4 ± 1,1 °dH, Chloridgehalt 0,2 mg/l, Phosphatgehalt ≤ 0,2 mg/l. Nach der Behandlung mit Aretit® wurden die verschiedenen Stadien sofort mit Frischwasser gespült. Während der anschließenden Frischwasserphase wurden die Tiere wieder in den Vollglasaquarien gehalten. In dieser Nachbeobachtungsperiode erfolgte alle 3 Tage ein Wasserwechsel. Die niedrige Wassertemperatur hatte eine entsprechend langsam ablaufende Entwicklung zufolge und damit auch bessere Möglichkeiten zur Beobachtung der zahlreichen Entwicklungsstadien.

Nach den Vorschlägen von Greenhouse (1976) wurden alle Stadien vom befruchteten Ei bis zu den selbständig fressenden Kaulquappen als Embryonalstadien bezeichnet. Diese wurden sodann nach Kopsch (1952) in Entwicklungsstufen eingeteilt (arabische Ziffern). Vom Beginn der selbständigen Nahrungsaufnahme bis zur Metamorphose handelt es sich um Larven-Stadien (Greenhouse 1976). Ihre Einteilung wurde nach Taylor und Kollros (1946) vorgenommen (römische Ziffern). Alle verwendeten Stadien sind in Tab. 1 mit fortschreitender Entwicklung zusammengefaßt.

Die Auswertung der Versuche mit den noch nicht geschlüpften Embryonen erfolgte erst nach dem Schlüpfen, da es nicht möglich war, den Zeitpunkt des Absterbens schon innerhalb der Gallerte sicher festzustellen. Abgestorbene Embryonen zeigten in diesen Stadien oft nach Tagen noch keine äußerlich erkennbaren Veränderungen. Bei Larven und den in der Metamorphose befindlichen Stadien wurde die Mortalitätsrate frühestens 24 h, verschiedentlich auch 48 h nach Versuchsende (im Frischwasser) bestimmt. Auch in diesen Fällen konnte durch häufig auftretende Lähmungen der Todeszeitpunkt oft nicht genau ermittelt werden. In der Regel wurde die mittlere letale Konzentration (LC_{50}), der letale Konzentrationsbereich (LC_{100}) und der Bereich der Grenzkonzentration (GC) - letztere nur bei bereits geschlüpften Tieren - festgestellt. Auch

der Ablauf der Schlüpfens wurde untersucht. Mißbildungen wurden unter dem Binokular registriert und in Abhängigkeit von der Konzentration bzw. vom Entwicklungsstadium dargestellt. Die Überlebensfähigkeit wurde durch Nachbeobachtung bis zur Metamorphose geprüft. Eindeutig geschädigte Individuen wurden in Bouin fixiert und histologisch aufgearbeitet. Eine chronische Intoxikation über 10 Tage ermöglichte es, den Einfluß auf das Längenwachstum und die Gewichtszunahme zu untersuchen. Dazu diente je ein Embryonal- und ein Larvalstadium. Ferner wurde während einer chronischen Vergiftung der Einfluß auf die Geschwindigkeit der Metamorphose geprüft. Auf Einzelheiten der Methode wird an entsprechender Stelle eingegangen.

Tab. 1: In den Versuchen verwendete Entwicklungsstadien 1-26. Die Einteilung erfolgt entsprechend nach Kopsch (1952) sowie Taylor und Kollros (1946) mit Längen- und Altersangabe.

Versuchsgruppe	Merkmale	Entwicklungsstufe nach Kopsch
Embryonalstadien		
1	2-Zellstadium	1
2	grobe Morula	3
3	späte Gastrula	6
4	frühe Neurulation	7
5	späte Neurulation	9
6	Schwanzknospenstadium	10
7	Muskularaktivität	11
8	schlüpfende Stadien	12
9	Alter: 1 Tag Länge: 6,0 ± 0,25 mm	12, 13
10	Alter: 5 Tage Länge: 8,8 ± 0,25 mm	14
11	Alter: 6 Tage Länge: 9,0 ± 0,20 mm	14
12	Alter: 8 Tage Länge: 10,0 ± 0,10 mm	15
13	Alter: 9 Tage Länge 12,2 ± 0,36 mm	17
14	Alter: 12 Tage Länge: 13,3 ± 0,60 mm	18

Tab. 1: Fortsetzung

Versuchsgruppe	Merkmale	Entwicklungsstufe nach Taylor und Kollros
Larvalstadien		
15	Alter: 15 Tage Länge: 15,5 ± 0,53 mm	I
16	Alter: 23 Tage Länge: 19,5 ± 0,90 mm	II
17	Alter: 26 Tage Länge: 20,4 ± 1,02 mm	III
18	Alter: 30 Tage Länge: 20,4 ± 1,18 mm	III, IV
19	Alter: 36 Tage Länge: 20,8 ± 1,25 mm	IV
20	Alter: 44 Tage Länge: 20,8 ± 1,25 mm	IV, V
21	Alter: 55 Tage Länge: 25,4 ± 0,89 mm	VI
22	Alter: 64 Tage Länge: 28,2 ± 0,62 mm	VI, VII
23	Alter: 70 Tage Länge: 31,3 ± 0,82 mm	VIII, IX
24	Alter:[1] - Länge: 38,7 ± 0,93 mm	XVI, XVII
Metamorphe Stadien		
25	Alter: - Länge: 41,8 ± 2,32 mm	XIX
26	Alter: - Länge: 41,3 ± 1,76 mm	XX

[1] Von diesem Stadium an wurde auf eine Altersangabe verzichtet, da zur Einleitung der Metamorphose die Wassertemperatur erhöht werden mußte.

IV. Ergebnisse

A. Versuche mit 1-stündiger Behandlungsdauer

1. LC_{50}-Wert, letaler Konzentrationsbereich und Bereich der Grenzkonzentration der verschiedenen Entwicklungsstadien

Die Auswirkungen von Aretit® auf die Entwicklungstadien (Embryonen und Larven) sind in Tab. 2 in der Reihenfolge der Entwicklung zusammengefaßt. Es zeigte sich, daß die Toleranz der Tiere von den ersten Teilungsstadien bis zum Stadium der fortgeschrittenen Neurulation erheblich ansteigt und in Gruppe 5 den höchsten LC_{50}-Wert (82,02 ppm) erreicht. Auch die letale Konzentration lag bei diesen Entwicklungsstadien noch extrem hoch. Unmittelbar danach stieg die Empfindlichkeit wieder an (Gruppe 6, 7). In der Gruppe 9 (1. Tag nach Verlassen der Eihülle) kam es noch zu keiner wesentlichen Steigerung der Empfindlichkeit. Erst im Alter von 15 - 16 Tagen nach dem Schlüpftermin stieg diese fast sprunghaft auf einen LC_{50}-Wert von nur 0,81 ppm (letale Konzentration: $1 < LC \leq 2{,}0$ ppm; Tab. 2). Zu diesem Zeitpunkt ernährten sich die Kaulquappen bereits selbständig; ihr Dottersack war weitgehend aufgezehrt. Bis zu einem Alter von 44 Tagen (Gruppe 16 - 20) verlief die Entwicklung der Kaulquappen ohne große morphologische Veränderungen. Ihre Toleranz veränderte sich in diesem Zeitraum kaum (LC_{50}-Wert 2,0 - 2,7 ppm). Auch in der nachfolgenden Zeitspanne, die durch ein rasches Wachstum gekennzeichnet ist, waren die Veränderungen in den Konzentrationsbereichen nur gering. Die große Toleranz der frühen Embryonalstadien wurde in keiner Gruppe wieder erreicht (letale Konzentration < 5 ppm).

Tab. 2: Konzentrationsbereich, LC_{50}-Wert, Grenzkonzentration und letale Konzentration bei den untersuchten Entwicklungsstadien von Rana temporaria. Behandlungsdauer 1 h.

Versuchsgruppe Nr.	Aretit® Konzentrationsbereich (ppm)	Zahl der Versuchstiere pro Konzentration[1]	LC_{50} (ppm)	95 % Vertrauensgrenzen (ppm)	Gleichung der Probitgeraden y = Probit x = lg (Dosis)	Grenzkonzentration[2] (ppm)	Letale Konzentration (ppm)
Embryonalstadien							
1	0,1 – 100,0	99 – 104	13,01	11,90 und 14,11	y = 1,84 + 2,83x		40,0 < LC ≤ 50,0
2	0,1 – 150,0	98 – 104	29,61	27,36 und 31,86	y = 1,68 + 2,26x		50,0 < LC ≤ 70,0
3	5,0 – 80,0	62 – 82	46,09	41,79 und 50,40	y = 0,54 + 3,33x		60,0 < LC ≤ 80,0
4	10,0 – 100,0	48 – 58	53,15	48,97 und 57,32	y = 1,55 + 3,80x		60,0 < LC ≤ 80,0
5	2,5 – 120,0	46 – 70	82,02	64,69 und 99,35	y = 2,28 + 1,42x		LC >120,0[3]
6	5,0 – 50,0	60 – 72	40,00	38,20 und 41,80	y = 39,93 +28,05x		LC > 50,0
7	2,5 – 40,0	48 – 69	29,23	23,80 und 34,67	y = -0,75 + 3,92x		LC > 50,0
9	2,5 – 50,0	20	24,88	21,41 und 28,34	y = -1,97 + 5,00x	5,0 ≤ GC < 10,0	40,0 < LC ≤ 50,0
10	1,0 – 40,0	20	11,25	10,35 und 12,15	y = 0,20 + 4,43x	3,0 ≤ GC < 5,0	10,0 < LC ≤ 15,0
11	0,1 – 30,0	20	8,53	6,88 und 10,18	y = 1,35 + 3,93x	2,0 ≤ GC < 3,0	16,0 < LC ≤ 18,0
13	2,5 – 40,0	20	22,17	19,00 und 25,33	y = -1,29 + 4,62x	5,0 ≤ GC < 10,0	30,0 < LC ≤ 40,0
14	1,0 – 40,0	20	8,34	5,59 und 11,09	y = 2,70 + 2,50x	3,0 ≤ GC < 5,0	30,0 < LC ≤ 40,0
Larvalstadien							
15	0,5 – 50,0	10	0,81	0,70 und 0,90	y = 6,30 +13,96x	0,5 ≤ GC < 0,7	1,0 < LC ≤ 2,0
16	0,2 – 5,0	10	1,96	1,83 und 2,09	y = -3,40 +28,73x	0,5 ≤ GC < 1,0	2,0 < LC ≤ 5,0
17	0,1 – 5,0	10	2,87	2,64 und 3,11	y = -0,18 +11,31x	0,7 ≤ GC < 1,0	3,7 < LC ≤ 4,0
18	1,0 – 5,0	10	2,18	2,00 und 2,36	y = -0,58 +16,50x	1,0 ≤ GC < 1,5	2,0 < LC ≤ 3,0
19	0,7 – 3,0	10	2,44	1,48 und 3,40	y = -11,38 +42,30x	1,0 ≤ GC < 2,0	2,0 < LC ≤ 3,0
20	1,4 – 4,0	10	2,72	2,60 und 2,85	y = -8,78 +13,77x	GC < 1,4	3,0 < LC ≤ 4,0
21	1,5 – 5,0	10	3,81	3,57 und 4,05	y = -6,88 +20,45x	1,5 ≤ GC < 2,0	4,0 < LC ≤ 5,0
22	1,5 – 7,0	10	3,59	3,18 und 4,00	y = -0,90 +10,63x	1,5 ≤ GC < 2,0	4,0 < LC ≤ 5,0
23	1,0 – 5,0	10	3,08	2,70 und 3,46	y = 1,01 + 8,16x	1,0 ≤ GC < 2,0	3,5 < LC ≤ 4,0
24	2,0 – 7,0	10	3,05	2,81 und 3,29	y = -1,42 +13,26x	GC < 2,0	3,5 < LC ≤ 4,0
25	1,0 – 7,0	10	4,07	3,50 und 4,65	y = 3,50 + 4,65x	1,0 ≤ GC < 2,0	5,0 < LC ≤ 6,0
26	1,0 – 8,0	10	2,59	2,13 und 3,06	y = 1,00 + 9,65x	1,0 ≤ GC < 2,0	4,0 < LC ≤ 5,0

[1] In den Versuchsgruppen 1-7 wurde zur Schonung der Embryonen die genaue Zahl der Embryonen erst am Versuchsende ermittelt.
[2] Die Grenzkonzentration konnte nur bei bereits geschlüpften Stadien ermittelt werden.
[3] Der letale Konzentrationsbereich war bei der höchsten geprüften Konzentration noch nicht erreicht.

Der genaue Zeitpunkt des Todes ließ sich bei den frühen Entwicklungsstadien erst einige Tage nach der Behandlung feststellen, da die Embryonen - soweit äußerlich erkennbar - mit einem "Entwicklungsstillstand" reagierten. Diese Pause dehnte sich bisweilen auf 4 Tage aus; erst dann erfolgte bei den Überlebenden eine sichtbare Weiterentwicklung. Aus diesem Grund war nur das Stadium, in welchem der Tod erfolgte, eindeutig feststellbar.
Es fiel auf, daß bei den noch nicht geschlüpften Entwicklungsstadien der weitaus größte Teil der absterbenden Tiere dem Behandlungsstadium selbst oder der unmittelbar darauf folgenden Entwicklungsstufe angehörte. In der Versuchsgruppe 1 (Behandlung im 2-Zellstadium) starben bei Konzentrationen ≤ 30 ppm etwa 70 % der Tiere schon im Versuchsstadium. Bei Konzentrationen > 30 ppm stieg der Anteil auf 85 - 90 %. Die übrigen Embryonen entwickelten sich noch bis zur beginnenden Auffaltung der Keime und starben dann ab. Bei Versuchsgruppe 2 (Zeitpunkt der Behandlung: Morulastadium) starb kein Embryo mehr wenn das Neurulastadium erreicht war. In den Versuchsgruppen 3 - 6 waren die Ergebnisse ähnlich. 70 - 90 % starben jeweils schon im Behandlungsstadium. Der Rest überlebte nur noch das unmittelbar darauf folgende Stadium.
Nach dem Verlassen der Eihülle war der Zeitpunkt zu dem der Tod eintrat nur noch schwer feststellbar, da die Differenzierungs- und Wachstumsvorgänge innerhalb der Versuchszeit und der nachfolgenden Beobachtung äußerlich nicht mehr sichtbar waren. Außerdem zeigten die Kaulquappen häufig über Tage hinweg totale Lähmungen, so daß die endgültige Beurteilung erst 24 - 48 h nach Versuchsende möglich war. An den toten Kaulquappen löste sich jetzt auch das Epithel der Haut ab. In den Gruppen 7 und 9 (Behandlungszeitpunkt kurz vor oder nach dem Schlüpfen) traten Todesfälle noch 8 Tage nach Versuchsende auf; Lähmungen hielten bei den geschädigten Tieren bis zu 10 Tagen an. Nach der Umstellung auf äußere Ernährung lagen die Todes-

zeiten ausnahmslos innerhalb der ersten 72 h nach Versuchsende. Die gleichen Verhältnisse stellten sich auch bei allen folgenden Entwicklungsstadien bis zur Metamorphose ein.

2. Auswirkungen auf die Schlüpftermine

Innerhalb der Schlüpfperiode wurde 11 Tage lang alle 24 h, vom 12. bis zum 20. Tag alle 48 h die Zahl der geschlüpften Embryonen gezählt. Abb. 1 gibt einen Überblick über die Beziehungen zwischen der Konzentration und der jeweiligen Schlüpfrate in %. In der Abbildung sind die Ergebnisse der Versuchsgruppe 1 - 7 (Entwicklungsstadien) zusammengefaßt. In den Abb. 2 - 6 sind die für die Entwicklungsstadien Blastula, Gastrula, Neurula, Schwanzknospenstadium, das Stadium beginnender Muskelaktivität sowie für das Stadium unmittelbar vor dem Schlüpfen verwendeten Konzentrationen, der Zeitraum vom Anfang bis Ende der Schlüpfperiode, aber auch die Schlüpfrate zu jedem Zeitpunkt abzulesen. Es ist zu berücksichtigen, daß die absolute Zahl der geschlüpften Tiere mit steigender Konzentration durch die zahlreichen Todesfälle abnimmt. Die Anzahl der geschlüpften Embryonen pro Konzentration ist jedoch in jedem Fall gleich 100 % gesetzt.

Die bereits im 2-Zellstadium mit Aretit® behandelten Individuen zeigten keine Veränderungen des Schlüpfzeitraumes gegenüber den Kontrollen. In beiden Fällen dauerte er etwa 6 Tage

Eine Behandlung während des Blastulastadiums führte zu einer ersten Veränderung. Bei Konzentrationen < 10 ppm erfolgte das Schlüpfen frühzeitig (1. - 5. Tag), bei Konzen-

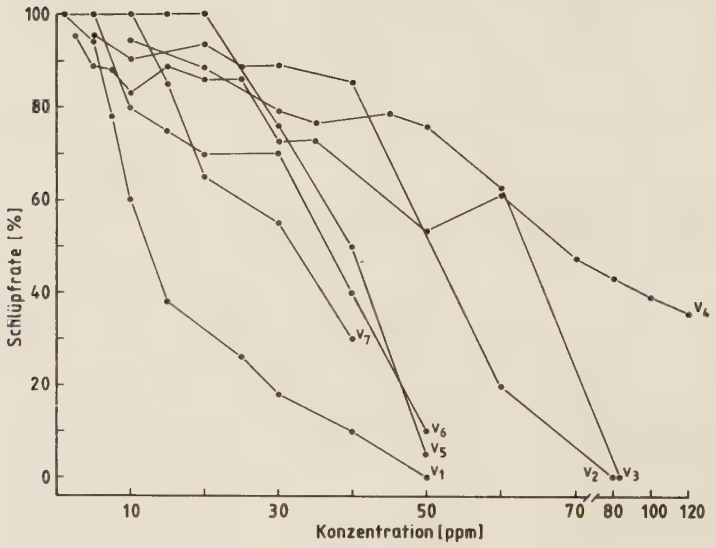


Abb. 1: Schlüpfrate (%) in Abhängigkeit von der Aretit®-Konzentration in den Versuchsgruppen V_1 - V_7.

trationen > 15 ppm dagegen verspätet (2. - 6. Tag). Auch die maximale Schlüpfrate verlagerte sich vom 3. bis zum 5. Tag (Abb. 2).

Wurden die Embryonen im Gastrulastadium mit Aretit® behandelt, so erfolgte bereits bei 5 ppm ein verspätetes Schlüpfen, das sich zudem mit steigender Konzentration bis auf 7 Tage ausdehnte (Kontrolle 5 Tage). Mit Ausnahme der höchsten Konzentration (60 ppm), bei der 75 % aller schlüpfenden Embryonen erst am letzten Tag die Eihüllen verliessen, ergab sich keine wesentliche Veränderung bei der Verteilung auf die einzelnen Tage (Abb. 3).

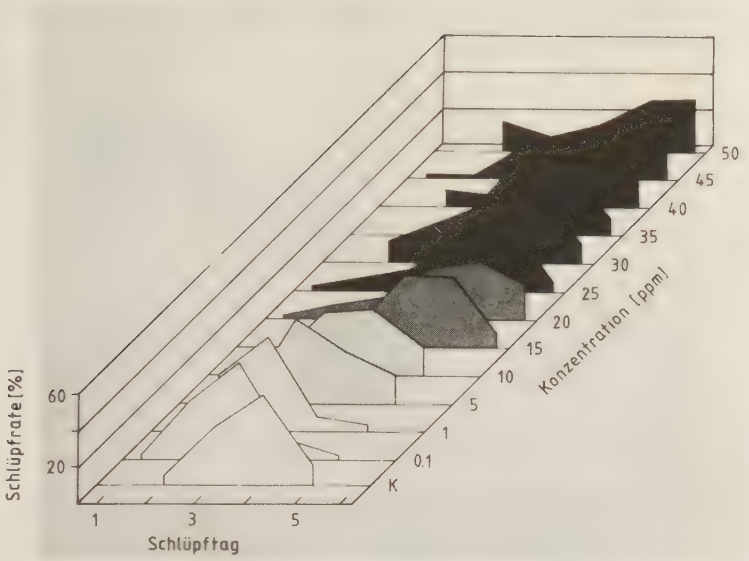


Abb. 2: Einwirkung von Aretit® im Blastulastadium (Versuchsgruppe 2). Schlüpfzeitpunkte und Prozentsatz geschlüpfter Embryonen nach vorausgehender Behandlung mit Aretit®. Auf der x-Achse ist der Schlüpfzeitraum, auf der y-Achse die Schlüpfrate in %, auf der z-Achse die Konzentration in ppm aufgetragen.

Auch die Behandlung im Stadium der Neurulation veränderte im Zusammenhang mit der Konzentration den Schlüpfbeginn und die Dauer des gesamten Zeitraumes. Während bei 40 bis 50 ppm noch immer bis zu 10 % der Embryonen innerhalb der ersten 5 Tage die Eihüllen durchbrachen, trat bei 60 ppm eine deutliche Verzögerung ein. Hier schlüpften die Tiere frühestens am 5. Tag (Abb. 4). Bei 50 ppm übertraf die Ausdehnung des gesamten Zeitraumes den der Kontrollen

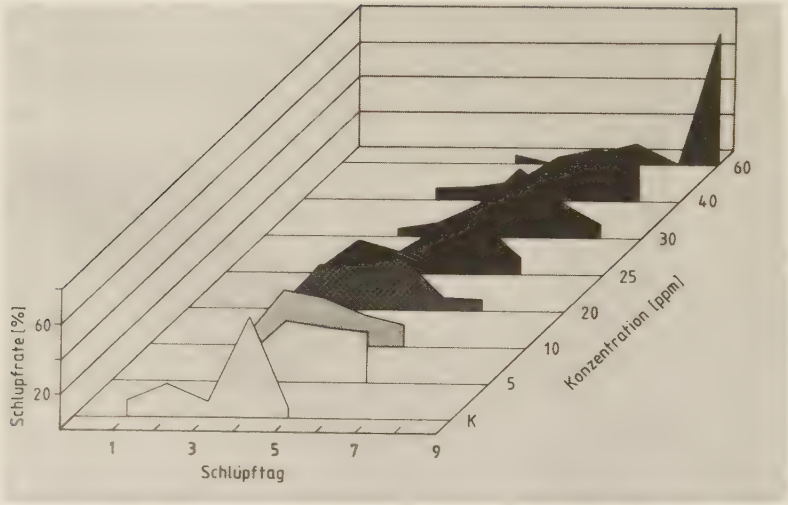


Abb. 3: Einwirkung von Aretit® im Gastrulastadium (Versuchsgruppe 3). Erklärungen wie in Abb. 2.

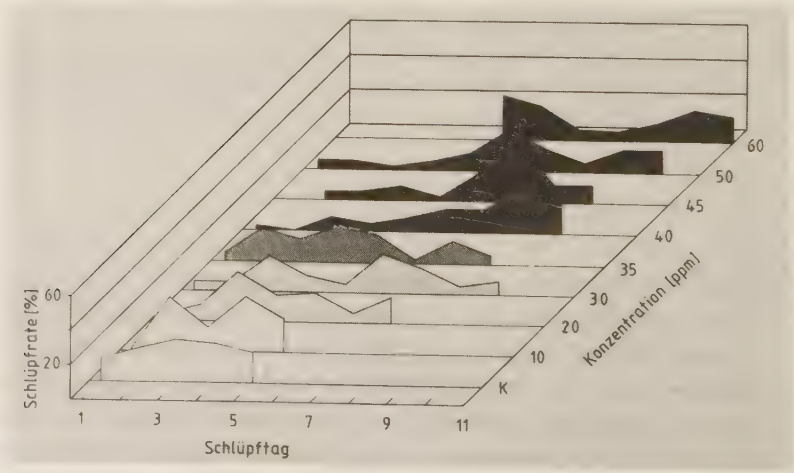


Abb. 4: Einwirkung von Aretit® im Neurulastadium (Versuchsgruppe 4). Erklärungen wie in Abb. 2.

(5 Tage) bis zu 100 %. Das bei den Kontrollen in der Mitte des Schlüpfzeitraumes liegende Maximum der Schlüpfrate war in keinem Konzentrationsbereich wiederzufinden. Verschiedentlich traten sogar 2 Maxima auf (Abb. 4).

Eine klare Verzögerung der Schlüpftermine mit steigender Konzentration ergaben auch die Versuche im Schwanzknospenstadium. Sie erreichte bei 120 ppm sogar 3 Tage. Gleichzeitig erfolgte eine starke zeitliche Streuung der Schlüpfvorgänge (Abb. 5).

Bei den in Stadium 6 (gekennzeichnet durch beginnende Muskelaktivität) getauchten Individuen veränderte sich das Ergebnis erneut. Der Schlüpfzeitraum war bei den Kontrol-

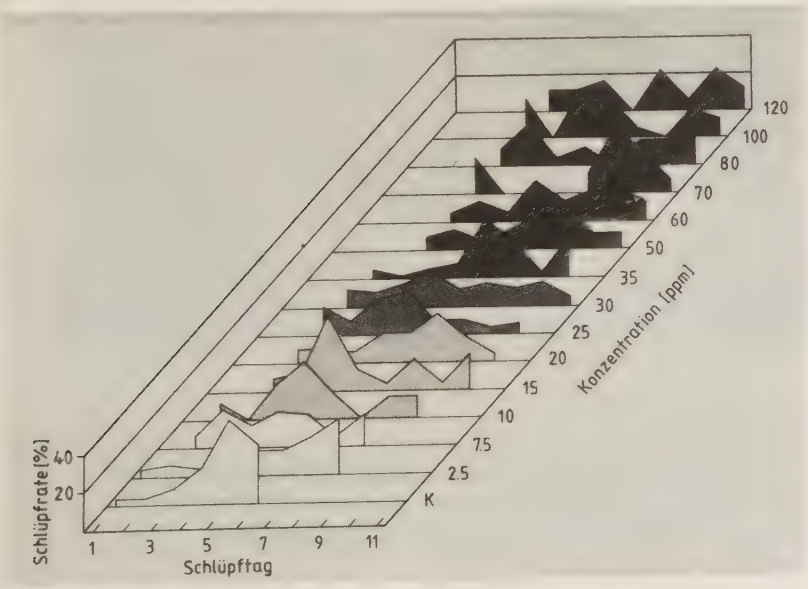


Abb. 5: Einwirkung von Aretit® im Schwanzknospenstadium (Versuchsgruppe 5). Erklärungen wie in Abb. 2.

len wie bei den Versuchsgruppen 0,05 - 0,5 ppm gleich. Das Schlüpfen begann nach 48 h. Innerhalb eines Tages waren bei Konzentrationen ≥ 1 ppm alle Individuen geschlüpft (Abb. 6); kein Tier verblieb in der Eihülle. Ähnlich verhielt sich auch die Versuchsgruppe 7.

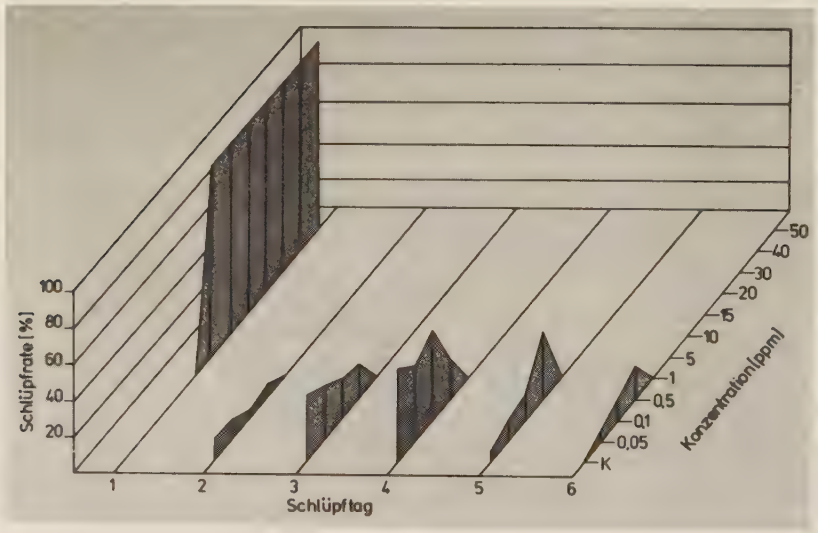


Abb. 6: Einwirkung von Aretit® im Stadium beginnender Muskelaktivität (Versuchsgruppe 6). Erklärungen wie in Abb. 2. Zur übersichtlicheren Darstellung sind die Schlüpfraten bei den untersuchten Konzentrationen durch einen Polygonzug verbunden.

3. Tauchversuche bei Embryonen mit und ohne Ei- und Gallerthülle

Die Frage, inwieweit die Embryonen durch die Ei- und Gallerthülle gegenüber Aretit® geschützt sind, wurde in den folgenden Versuchen geklärt. 8 x 20 Gastrulastadien wurden je 1 h in 8 Konzentrationsstufen von 5 – 50 ppm getaucht, gespült und in Frischwasser umgesetzt. Entsprechend wurden 8 x 20 Gastrulastadien aus ihrer Gallert- und Eihülle mit Rubispinzetten unter dem Binokular entfernt und der gleichen Behandlung unterzogen. Als Kontrollen dienten 20 Individuen mit Ei- und Gallerthülle sowie 20 weitere, denen mit dem gleichen Eingriff die Ei- und Gallerthüllen entfernt wurden. Nach der 1-stündigen Behandlung wurden die Eier in Teesiebe gelegt, die von unten her belüftet waren. Durch die dauernde Turbulenz sollte das Verpilzen vermieden werden. In einer 2. und 3. Versuchsreihe wurden in gleicher Weise Embryonen der Stufen 10 und 11 (jeweils 10 Individuen pro Konzentration) geprüft. Auf eine 24 h Behandlung wurde wegen der hohen Verpilzungsgefahr verzichtet.

Gastrulastadium: Trotz der ständigen Bewegung trat bereits bei 10 ppm ca. 24 h nach Versuchsende bei den Embryonen ohne Hülle Verpilzung auf. Nur noch 6 der 20 Embryonen schlüpften, alle übrigen verpilzten. Einzelne Tiere entwickelten sich noch bis zu einer Konzentration von ≤ 25 ppm; bei höheren Konzentrationen verpilzten alle Embryonen innerhalb von 2 – 3 Tagen. Von den operierten Kontrollen entwickelten sich 18 Individuen vollständig, 2 verpilzten. Eine mechanische Beschädigung der beiden Embryonen beim Entfernen der Hüllen war nicht auszuschließen.
Die mit Hülle vergifteten Gastrulastadien zeigten dagegen in allen untersuchten Konzentrationsbereichen viel höhere Schlüpfraten. Bei den Kontrollen überlebten alle Versuchstiere (Tab. 3). Die schützende Wirkung der Ei- und Gallerthülle für die Gastrulastadien geht aus diesen Versuchen bereits klar hervor. Ob der Tod der Embryonen primär durch die Behandlung mit Aretit® eintritt oder eine Folge der Schädigung und der nachfolgenden Verpilzung ist, bleibt offen.

Tab. 3: Zahl überlebender Embryonen mit und ohne Eihülle nach vorangegangener 1-stündiger Aretit®-Behandlung im Gastrulastadium.

Konzentration (ppm)	Zahl der Versuchstiere pro Ansatz	Zahl überlebender Embryonen ohne Hülle	mit Hülle
Kontrollen	20	18	20
10	20	6	19
15	20	8	20
20	20	6	20
25	20	2	17
30	20	–	17
40	20	–	13
45	20	–	14
50	20	–	8

Schwanzknospenstadium (Stufe 10): Die Ergebnisse dieser 1-stündigen Behandlung sind in Tab. 4 zusammengefaßt. Auch hier waren die Mortalitätsraten in den einzelnen Versuchsgruppen unterschiedlich. Da alle Kontrollen überlebten und sich weiterentwickelten, konnte eine Probit-Analyse zur LC_{50} Bestimmung erfolgen. Bei den Embryonen mit Ei- und Gallerthülle betrug der LC_{50}-Wert 52,9 ppm, bei den operierten dagegen nur 31,3 ppm (Tab. 4). In keinem Fall erfolgte bei diesen Versuchen eine Verpilzung.

Stadium beginnender Muskelaktivität (Stufe 11): Die 1-stündige Aretit®-Intoxikation im fortgeschrittenen Schwanzknospenstadium ergab keine unterschiedliche Empfindlichkeit bei Embryonen, die mit bzw. ohne Ei- und Gallerthülle behandelt worden waren. Der LC_{50}-Wert betrug bei ersteren 32,2 ppm, bei letzteren 34,3 ppm.

Tab. 4: Zahl überlebender Embryonen, LC_{50}-Werte und Gleichung der Probitgeraden nach vorangegangener 1-stündiger Aretit®-Behandlung im Schwanzknospenstadium.

Konzentration (ppm)	Zahl der Versuchstiere pro Ansatz	Zahl überlebender Embryonen ohne Hülle	mit Hülle
Kontrollen	10	10	10
5	10	10	10
10	10	8	10
20	10	7	10
30	10	7	9
40	10	5	9
50	10	1	5
LC_{50}-Wert (ppm):		31,31	52,93
95 % Vertrauensgrenzen (ppm):		20,71 und 41,92	38,08 und 67,79
Gleichung der Probitgeraden y = Probit; x = lg (Dosis):		y = 1,13 + 2,58 x	y = - 6,29 + 6,55 x

B. Versuche mit 24-stündiger Behandlungsdauer

1. LC_{50}-Wert, letaler Konzentrationsbereich und Bereich der Grenzkonzentration der verschiedenen Entwicklungsstadien

Die Ergebnisse der 24-stündigen Behandlung wurden in Tab. 5 zusammengefaßt. Auch hier erwiesen sich die frühen Entwicklungsstadien (Blastula bis Neurula) als besonders widerstandsfähig. Ihre letalen Konzentrationsbereiche erstreckten sich von 2 - 5 ppm. Mit fortschreitender Entwicklung stieg auch bei der relativ langen Behandlungszeit die Empfindlichkeit wieder an. Ein Höhepunkt stellte sich bei Stadien ein, die gerade aus der Eihülle schlüpften, oder die bereits einen Tag zuvor die Eihüllen verlassen

Tab. 5: Konzentrationsbereich, LC_{50}-Wert, Grenzkonzentration und letale Konzentration bei den untersuchten Entwicklungsstadien von Rana temporaria. Behandlungsdauer 24 h.

Versuchs-gruppe	Aretit® Konzentrations-bereich (ppm)	Zahl der Versuchs-tiere pro Konz.[1]	LC_{50} (ppm)	95 % Vertrauens-grenzen (ppm)	Gleichung der Probitgeraden y = Probit x = lg (Dosis)	Grenzkon-zentration[2] (ppm)	Letale Kon-zentration (ppm)
Embryonalstadien							
2	0,1 - 10,5	59 - 89	1,18	1,07 und 1,28	y = 4,77 + 3,23 x		3,0 < LC ≤ 5,0
3	0,2 - 4,0	46 - 70	0,86	0,76 und 0,95	y = 5,21 + 3,10 x		3,0 < LC ≤ 4,0
4	0,3 - 3,0	53 - 67	0,69	0,62 und 0,76	y = 5,60 + 3,77 x		2,0 < LC ≤ 3,0
5	0,3 - 3,0	41 - 55	1,04	0,96 und 1,12	y = 4,92 + 4,46 x		2,0 < LC ≤ 3,0
6	0,3 - 2,0	40 - 64	1,27	1,12 und 1,43	y = 4,69 + 2,98 x		LC > 2,0[3]
7	0,1 - 2,5	20	0,69	0,55 und 0,82	y = 5,76 + 4,66 x		1,0 < LC ≤ 1,5
8	0,1 - 2,0	20	0,22	0,17 und 0,26	y = 8,17 + 4,78 x		0,3 < LC ≤ 0,6
9	0,02 - 0,5	20	0,05	0,04 und 0,06	y = 52,41 + 36,24 x	0,02 ≤ GC < 0,04	0,04 < LC ≤ 0,06
11	0,02 - 0,5	20	0,07	0,06 und 0,08	y = 46,76 + 35,73 x	0,02 ≤ GC < 0,04	0,06 < LC ≤ 0,08
12	0,01 - 0,5	20	0,11	0,09 und 0,13	y = 27,87 + 23,71 x	0,04 ≤ GC < 0,06	0,1 < LC ≤ 0,2
Larvalstadien							
15	0,01 - 0,3	20	0,05	0,04 und 0,06	y = 1,32 + 5,71 x	0,01 ≤ GC < 0,02	0,08 < LC ≤ 0,1
16	0,05 - 0,7	20	0,37	0,35 und 0,39	y = 10,92 + 13,79 x	0,1 ≤ GC < 0,2	0,5 < LC ≤ 0,7
18	0,2 - 1,0	20	0,56	0,51 und 0,62	y = 7,41 + 9,64 x	0,3 ≤ GC < 0,35	0,6 < LC ≤ 0,8
19	0,2 - 1,0	10	0,53	0,49 und 0,56	y = 21,40 + 58,74 x	0,3 ≤ GC < 0,4	0,5 < LC ≤ 0,6
21	0,4 - 1,5	10	0,58	0,53 und 0,64	y = 7,48 + 10,69 x	0,3 ≤ GC < 0,4	0,7 < LC ≤ 0,8
22	0,2 - 1,7	10	0,42	0,36 und 0,49	y = 8,53 + 9,45 x	GC < 0,2[4]	0,5 < LC ≤ 0,7
23	0,2 - 1,0	10	0,37	0,32 und 0,41	y = 9,44 + 10,18 x	GC < 0,2	0,4 < LC ≤ 0,5
25	0,1 - 1,5	10	0,41	0,37 und 0,44	y = 14,49 + 24,38 x	0,1 ≤ GC < 0,3	1,0 < LC ≤ 1,5
26	0,2 - 1,0	10	0,37	0,22 und 0,51	y = 11,71 + 15,45 x	GC < 0,2	0,4 < LC ≤ 0,7

[1] In den Versuchsgruppen 1-8 wurde zur Schonung der Embryonen die genaue Zahl der Tiere erst am Versuchsende ermittelt.
[2] Die Grenzkonzentration konnte nur bei bereits geschlüpften Stadien ermittelt werden.
[3] Der letale Konzentrationsbereich war bei der höchsten geprüften Konzentration noch nicht erreicht.
[4] Der Bereich der Grenzkonzentration war bei der niedrigsten geprüften Konzentration bereits erreicht.

hatten (LC_{50} 0,22 und 0,05 ppm in den Gruppen 8 und 9). Alle folgenden, bis zum Beginn der selbständigen Nahrungsaufnahme gekennzeichneten Gruppen, erwiesen sich als äusserst empfindlich. Erst im Alter von 23 Tagen (Stadium II) änderte sich die Situation; die Toleranz wurde erneut größer; sie erreichte aber auch hier nicht mehr die Ausgangswerte der frühen Embryonalstadien.

Es fiel auf, daß auch bei dieser längerfristigen Behandlung der frühen Entwicklungsstadien (bis Schwanzknospenstadium) die überwiegende Zahl an toten Individuen schon im Behandlungsstadium oder unmittelbar danach auftrat. Somit zeigte sich noch keine länger anhaltende Giftwirkung. Die Behandlung der Blastula-, Gastrula- und frühen Neurulastadien ergab ferner eine schon äußerlich erkennbare Entwicklungsunterbrechung von maximal 4 Tagen.
In Versuchsgruppe 2 starben bei 0,7 ppm und 1,0 ppm 80 bzw. 83 % noch im Behandlungsstadium, die übrigen Tiere in der frühen Gastrulation. Bei Konzentrationen $> 1,5$ ppm starben 100 % der geschädigten Tiere noch im Ausgangsstadium. Auch bei behandelten Gastrulastadien (Versuchsgruppe 3) lagen bei 0,9 ppm alle Todesfälle noch im gleichen Stadium. Von den im Neurulastadium behandelten Individuen starben bei Konzentrationen $\geq 1,5$ ppm 100 % der Embryonen noch im Behandlungsstadium selbst; bei 1,2 ppm waren es 90 %, bei 0,9 ppm 79 %, bei 0,3 ppm noch 33 %. Der Rest war am Ende der Neurulation ebenfalls tot. Die rasch ablaufende Vergiftung erfolgte in allen Gruppen einheitlich.
Die schlüpfenden Stadien, aber auch die bis zu 20 Tage alten Embryonen und Larven, zeigten letale Schädigung noch 7 Tage nach Versuchsende (in der Frischwasserphase). Mit fortschreitender Entwicklung, insbesondere nach dem 23. Tag (Stadium II), traten Todesfälle nur noch innerhalb der ersten 48 h nach Versuchsende auf.

Um zu prüfen, ob sich nach längerfristiger Behandlung mit Aretit® deutliche Veränderungen beim LC_{50}-Wert ergeben, wurden Gastrulastadien (Versuchsgruppe 3) bis zum Schlüpfen jeweils mit 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5 und 2,0 ppm behandelt. Die Substanz wurde einmalig einpipettiert, das Medium bis zum Schlüpfen nicht mehr gewechselt.
Der nach dem Schlüpfen ermittelte LC_{50}-Wert betrug 0,62 ppm (95 % Vertrauensgrenzen 0,58 und 0,66 ppm). Die Probitgeradengleichung lautete $y = 6{,}61 + 7{,}68\ x$. Dieser Versuch zeigte, daß sich die Empfindlichkeit gegenüber der 24 h Behandlung nur wenig erhöhte. Der letale Konzentrationsbereich lag dagegen deutlich niedriger ($1{,}0 < LC \leq 1{,}5$ ppm).
Die Embryonen starben bei mittleren Konzentrationen (0,1 bis 0,7 ppm) überwiegend im Stadium der Gastrulation, dagegen nur selten während der beginnenden Neurulation. Bei Konzentrationen > 0,7 ppm starben alle geschädigten Embryonen noch innerhalb der Gastrulation. In keinem Fall traten noch Todesfälle während der Neurulation auf.

2. Auswirkungen auf die Schlüpftermine

In Abb. 7 sind die Schlüpfraten in % in Beziehung zur Konzentration dargestellt. Die verwendeten Entwicklungsstadien umfaßten die Versuchsgruppen 2 - 8. In den Abb. 8 - 11 sind an 4 Entwicklungsstadien, wiederum in Abhängigkeit von der Konzentration, die Dauer der Schlüpfperiode und die Schlüpfraten abzulesen. Auch hier ist zu berücksichtigen, daß mit steigender Konzentration die absolute Zahl der geschlüpften Tiere durch die auftretenden Todesfälle abnimmt. Die Anzahl aller geschlüpften Tiere pro Konzentration ist jedoch in jedem Fall gleich 100 % gesetzt.

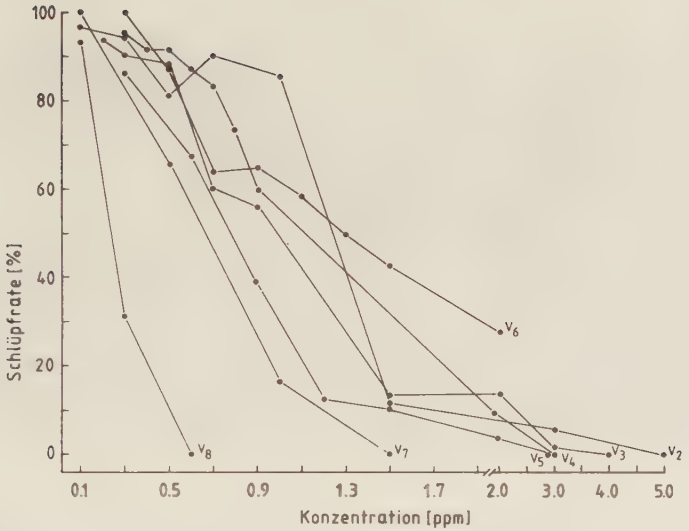


Abb. 7: Schlüpfrate (%) in Abhängigkeit von der Aretit®-Konzentration in den Versuchsgruppen V_2 - V_8.

Bei allen im Blastulastadium (Versuchsgruppe 2) behandelten Embryonen verzögerte sich mit steigender Konzentration der Schlüpfzeitraum zunehmend. Bei 3 ppm betrug die Verschiebung bereits 4 Tage. Bei Konzentrationen ≤ 0,3 ppm dauerte die ganze Periode 5 Tage, bei 0,5 - 1,0 ppm 6 - 7 Tage; bei den noch höheren Konzentrationen verringerte sich der Zeitraum wieder auf 4 - 5 Tage (Abb. 8).

Besonders starke Veränderungen verursachte die Behandlung im Gastrulastadium (Abb. 9). Der Schlüpfzeitraum verlängerte sich wieder mit steigender Konzentration (bis 0,9 ppm) bis auf 9 Tage (Kontrolle 6 Tage). Eine Verkürzung trat erneut bei den noch höheren Konzentrationen ein (4

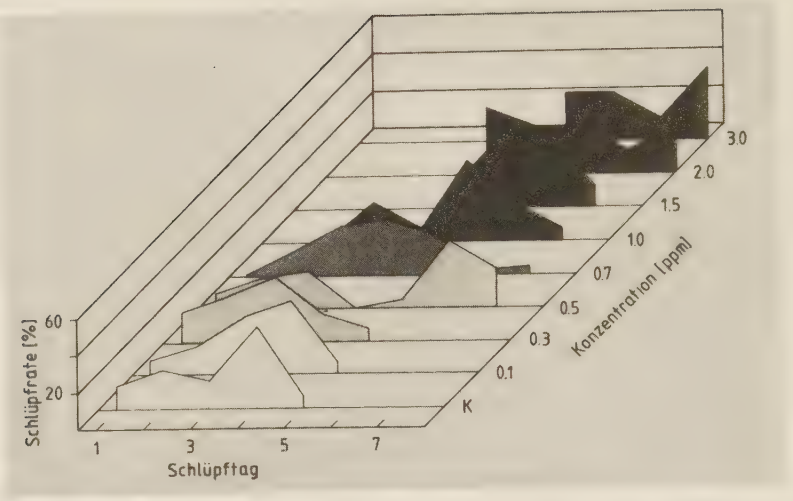


Abb. 8: Einwirkung von Aretit® im Blastulastadium (Versuchsgruppe 2). Schlüpfzeitpunkte und Prozentsatz geschlüpfter Embryonen nach vorausgehender Behandlung mit Aretit®. Auf der x-Achse ist der Schlüpfzeitraum, auf der y-Achse die Schlüpfrate in %, auf der z-Achse die Konzentration in ppm aufgetragen.

Tage bei 3 ppm). Der zeitliche Ablauf des Schlüpfens änderte sich ebenfalls. Bis zur Konzentration 0,7 ppm erfolgte der Vorgang über den ganzen Zeitraum kontinuierlich, bei noch höheren Konzentrationen stellten sich zwei Maxima jeweils zu Beginn und am Ende der Periode ein.

In Abb. 10 sind die Versuche dargestellt, in denen die Embryonalstadien zu Beginn der Neurulation behandelt wurden. Auch hier verzögerte sich der Schlüpfbeginn mit steigender Konzentration, bei 2 ppm sogar um 7 Tage. Die Mortalität betrug in diesem Bereich jedoch bereits 95%; es

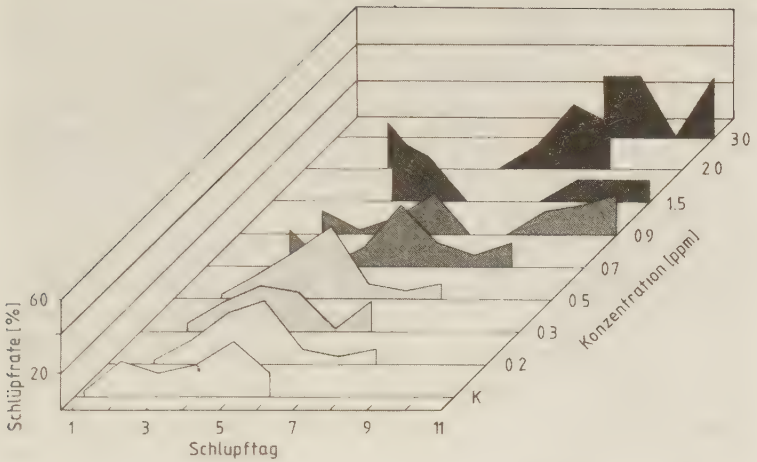


Abb. 9: Einwirkung von Aretit® im Gastrulastadium (Versuchsgruppe 3). Erklärungen wie in Abb. 8.

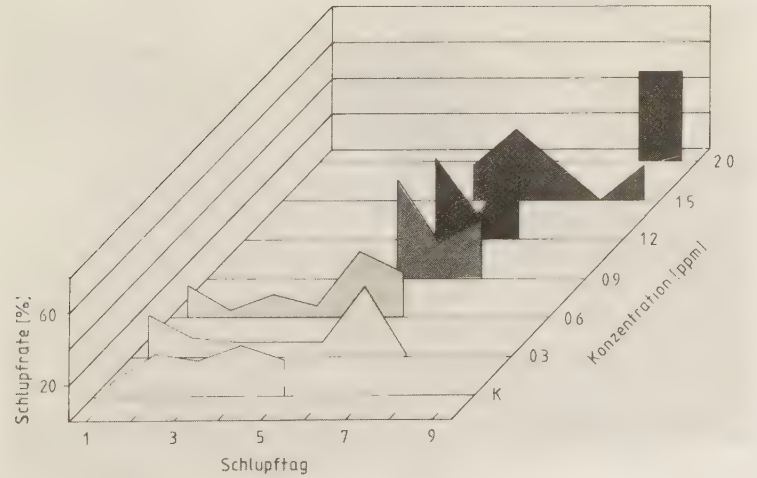


Abb. 10: Einwirkung von Aretit® im Neurulastadium (Versuchsgruppe 4). Erklärungen wie in Abb. 8.

überlebten nur noch 2 Tiere, die jeweils am 8. und 9. Tag schlüpften.

Die Behandlung aller späteren Embryonalstadien ergab im Vergleich mit den Kontrollen ein beschleunigtes Schlüpfen (Abb. 11). Wurden zum Beispiel die Tiere im Schwanzknospenstadium bei Konzentrationen > 0,9 ppm behandelt, so schrumpfte der Schlüpfzeitraum auf 3 Tage. Bereits 24 h nach Versuchsende hatten bei 1,1 ppm 73 %, bei 1,5 ppm 64 % und bei 2,0 ppm 63 % die Eihüllen verlassen. Standen die Entwicklungsstadien 2 - 3 Tage vor dem eigentlichen Schlüpfbeginn (Versuchsgruppe 7), so setzte der Schlüpfvorgang noch im Verlauf des 24 h Versuches ein. In keinem Fall starben Embryonen jedoch schon in der Eihülle sondern erst nach erfolgtem Schlüpfen.

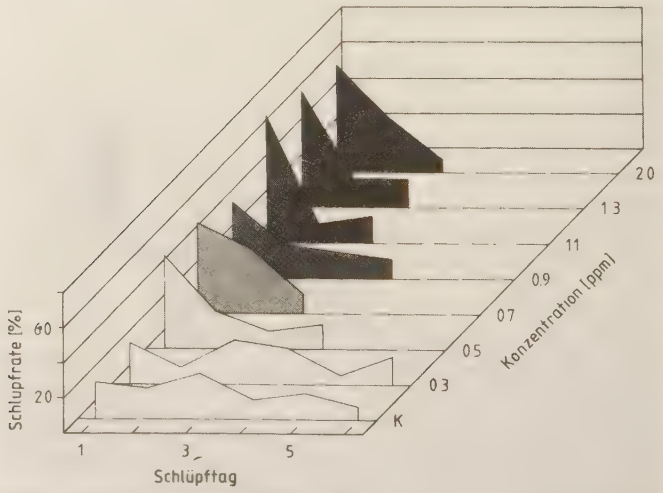


Abb. 11: Einwirkung von Aretit® im Schwanzknospenstadium (Versuchsgruppe 6). Erklärungen wie in Abb. 8.

C. Mißbildungen nach 1- bzw. 24-stündiger Behandlung

Sowohl nach 1-stündiger als auch nach 24-stündiger Behandlung von Blastula-, Gastrula- und frühen Neurulastadien, ferner bei frischgeschlüpften Embryonalstadien traten in verschiedenem Ausmaß Mißbildungen auf. Sie wurden unter dem Binokular untersucht, besonders gravierende Verkrüppelungen auch histologisch aufgearbeitet.
Die Fixierung erfolgte entweder in Bouinscher Flüssigkeit oder in 3,5 %igem Formol; in letzterem Falle wurden die Objekte nochmals in Bouinscher Flüssigkeit nachfixiert. Bei den noch nicht geschlüpften Tieren wurden die Eihüllen erst nach der Fixierung entfernt. Dies geschah in 80 %igem Alkohol. Die Entwässerung der Objekte erfolgte besonders langsam, um das Gewebe zu schonen und ein Platzen des Integumentes zu vermeiden. Die Färbung erfolgte mit Pikroblauschwarz nach Heidenhain bzw. Hämatoxylin-Säurefuchsin-Orange-Anilinblau nach Crossmon (Romeis 1968).

1. Behandlungsstadium Blastula (Versuchsgruppe 2)

1-stündige Behandlung: Die Zahl der Mißbildungen stand in Beziehung zur angewandten Konzentration. Bei ≤ 25 ppm waren bis zu 10 %, bei 30 ppm bis zu 26 % und bei 40 ppm bis zu 80 % der Individuen in verschiedenem Grade verkrüppelt. Bei Konzentrationen > 40 ppm stieg die Zahl der Mißbildungen bis auf 100 %.
Die im Blastulastadium behandelten Tiere zeigten mindestens 6 verschiedene Typen von Mißbildungen:

- Verkürzungen im Schwanzbereich (Abb. 12b, c),
- Verkrümmungen der Schwanzwirbelsäule (Abb. 12d, f),
- Ödeme in der Kopf- und Rumpfregion (Abb. 12c, e; 13a, c).
- Extrusionen im Dottersackbereich (Abb. 13a),
- Microcephalus (Abb. 12c, e; 13c, e, f),
- Schwanzduplikaturen (Abb. 13b, c, e, f).

Abb. 12: *Krüppelformen nach 1-stündiger Behandlung im Blastulastadium. Aretit®-Konzentrationen bis zu 30 ppm.*

a) Kontrolle.

b) 15 ppm, Verkürzungen der Schwanzregion.

c) 15 ppm, Ödembildung in Kopf- und Rumpfbereich. Der Schwanz ist verkürzt. Microcephalus.

d) 25 ppm, Verkrümmung der Schwanzwirbelsäule. Augen und Kiemen fehlen vollständig.

e) 30 ppm, Ödembildung in Kopf- und Rumpfbereich. Verkürzung der Schwanzregion. Augen und Kiemen sind nicht ausgebildet. Microcephalus.

f) 30 ppm, starke Verkrümmung der Wirbelsäule, Kiemen sind unvollständig ausgebildet.

Abb. 13: *Krüppelformen nach 1-stündiger Behandlung im Blastulastadium. Aretit®-Konzentrationen 35 und 40 ppm.*

a) 35 ppm, Ödembildung im Kopfbereich. Der Schwanz ist aufgebogen.

b) 35 ppm, Zweischwänzigkeit. Ausbildung einer medianen Rückenfurche.

c) 35 ppm, Zweischwänzigkeit; Kiemen sind nicht ausgebildet.

d) 35 ppm, der Dottersack ist auf der Ventralseite stark extrudiert. Knick in der Rumpfwirbelsäule.

e) 40 ppm, die Körperproportionen sind kaum mehr zu erkennen. Zweischwänzigkeit; die Augen treten blasig aus dem Kopf. Microcephalus.

f) 40 ppm, vollkommene Auflösung der Körperform. Augen stark heraustretend. Kiemen und Haftpapillen nicht angelegt; zwei stark verkrüppelte Schwänze. Microcephalus.

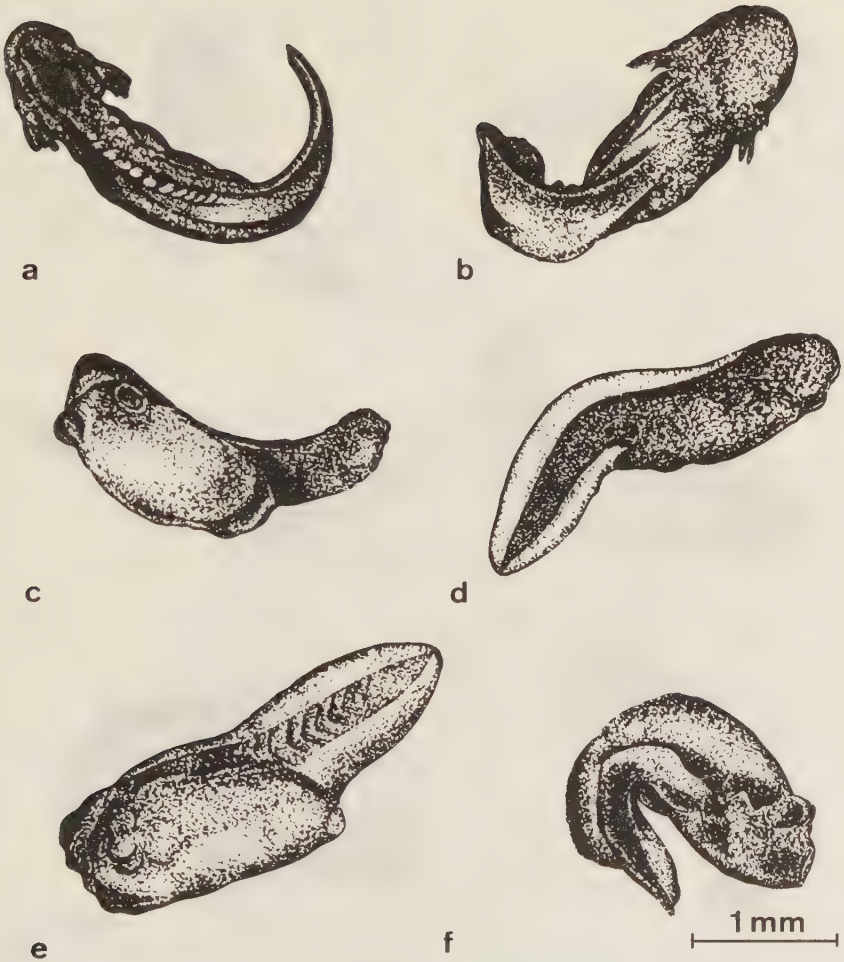


Abb. 12

Abb. 13

Die Schwanzduplikaturen erstreckten sich häufig als Furche bis in die Rückenregion (sog. "hollow back"). Die histologische Untersuchung zeigte, daß in allen Fällen noch eine Medullarrine (Kopsch, Stufe 8), nicht jedoch ein Medullarrohr (Stufe 9) ausgebildet wird. Knapp hinter dem Kopf weichen die Medullarwülste auseinander (Abb. 14c) und trennen sich vollständig (Abb. 14d). Das darunter liegende Notochord zieht - nach vorhergehender Abtrennung - in beide Schwanzabschnitte ein (Abb. 14c). Sein Querschnitt zeigt nicht mehr die typisch runde bis ovale Figur wie bei den Kontrollen, sondern ist nierenförmig (Abb. 14a). Gele-

---

Abb. 14: Entwicklung des Neuralrohres und des Notochordes bei vollständiger Duplikatur. 1-stündige Behandlung im Blastulastadium mit 40 ppm. Histologische Aufarbeitung unmittelbar vor dem Schlüpfen.

a) Gehörregion, Querschnitt: Das Notochord (N) ist noch ungeteilt, zeigt aber bereits eine ovale Gestalt.

b) Im Bereich der vorderen Rumpfregion sind einzelne vakuolisierte Zellen des Notochordes (N) abgegliedert (→).

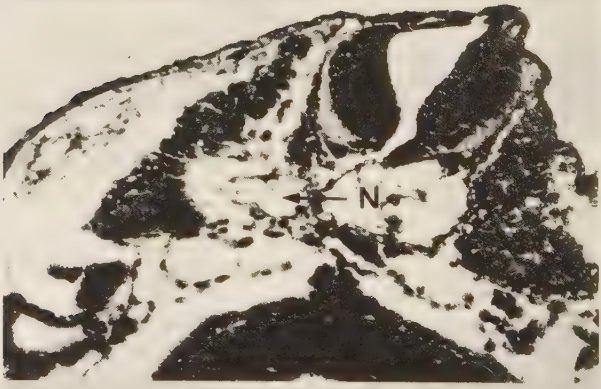
c) Verlagerung der Schnittebene um 200 µm caudalwärts; beide Stränge des Notochordes (N_1 und N_2) sind getrennt.

d) 150 µm caudalwärts sind die beiden Neuralwülste (Ne_1 und Ne_2) ebenfalls getrennt und von mesodermalem Zellmaterial der Lateralplatten (L) bzw. dem Ectoderm (Ec) umkleidet. Ein Verschluß der Neuralwülste zum Neuralrohr ist nicht erfolgt.

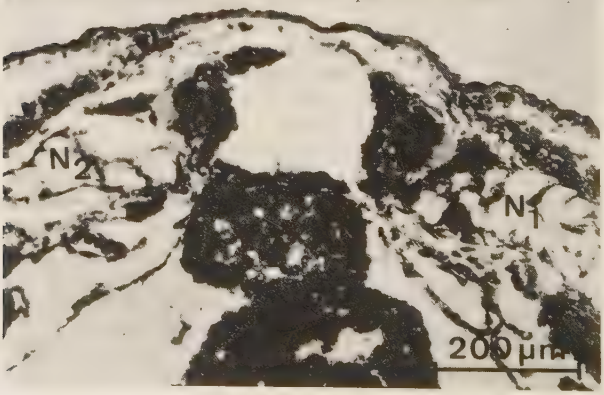
e) Mittlere Rumpfregion; Anlage einer vollständigen Duplikatur von Neuralwulst und Notochord und Ausbildung einer medianen Rückenfurche (R).

f) Gesamtquerschnitt durch den Embryo im mittleren Rumpfabschnitt. Da beide Schwänze (S_1 und S_2) über dem Tier kopfwärts gebogen sind, erscheinen sie auf dem Schnittbild.

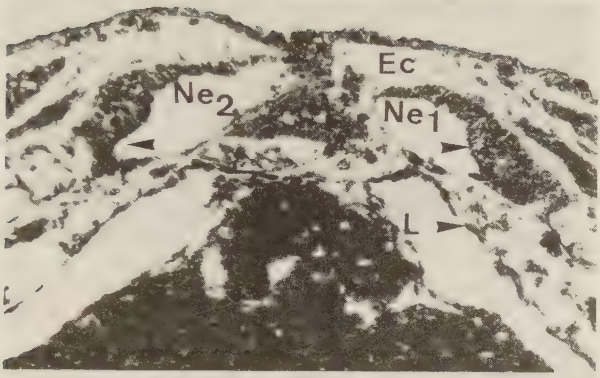
14a



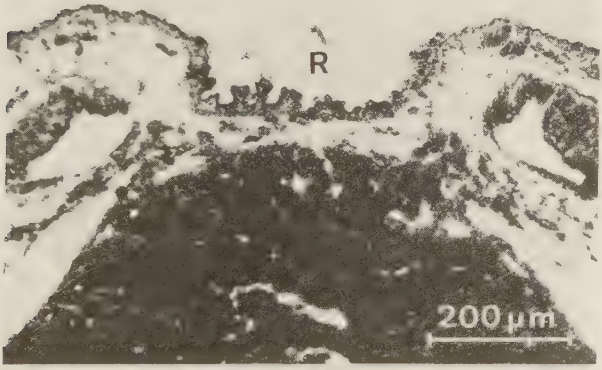
14b



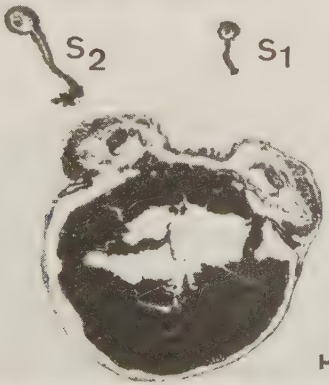
14c



14d



14e



14f

gentlich sind die Zellen durch eine pathologische Hyperplasie gekennzeichnet. Beide Neuralwülste schließen mit dem Notochord die mediane Rückenfurche ein (14e, f).

Die größten Deformationen traten bei Konzentrationen > 30 ppm auf. Sie umfaßten jedoch weniger als 10 % der Mißbildungen. Die durch Aretit® induzierten Mißbildungen reichten hier bis zur vollständigen Desorganisation der Körperstruktur (Abb. 13e, f). Die Krüppel waren in diesen Fällen nicht mehr als "Kaulquappen" zu erkennen.

24-stündige Behandlung: Auch bei der längeren Vergiftungsdauer (mit niedrigeren Konzentrationen) traten Mißbildungen auf. Bei 2 ppm zeigten bis zu 70 % der Individuen äusserlich erkennbare Schädigungen. Die histologischen Bilder reichten von vollkommener Desorganisation der Körperstruktur über Ödembildungen bis zu Extrusionen des Dottersackes (Abb. 15d, e). In einzelnen Fällen trat ein scharfer

---

Abb. 15: Schnitte durch Embryonen, die im Blastulastadium behandelt wurden.

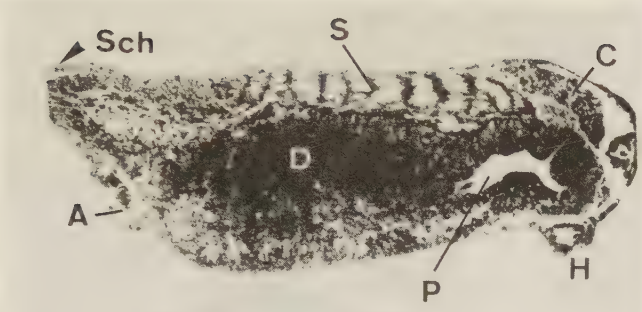
a) Kontrolle (Längsschnitt). 2 - 3 Tage vor dem Schlüpfen (A = Anus; C = Cephalon; D = Dotterzellen; H = Haftdrüsen; P = Pharynx; S = Somiten; Sch = Schwanzknospe).

b) Behandlung 1 h mit 60 ppm (Längsschnitt). Bildung von Ödemen und starke Biegung der Schwanzwirbelsäule (D = Dotterzellen; G = Gehörvesikel; H = Haftdrüsen; He = Herz; P = Pharynx).

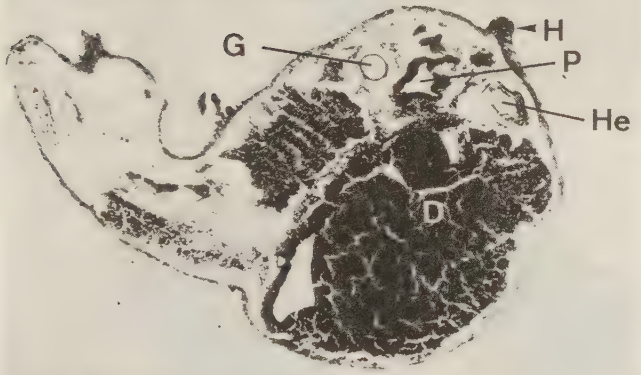
c) Behandlung 24 h mit 1 ppm (Längsschnitt). Ödem in der Bauchregion; beginnende Auflösung des Dottersackes (→) (D = Dotterzellen; K = Kopfregion; S = Somiten).

d) Behandlung 24 h mit 2 ppm (Längsschnitt). Ödem in der Rumpfregion. Auflösung der Körperstruktur (E = Embryo; Rf = flüssigkeitsgefüllter Raum).

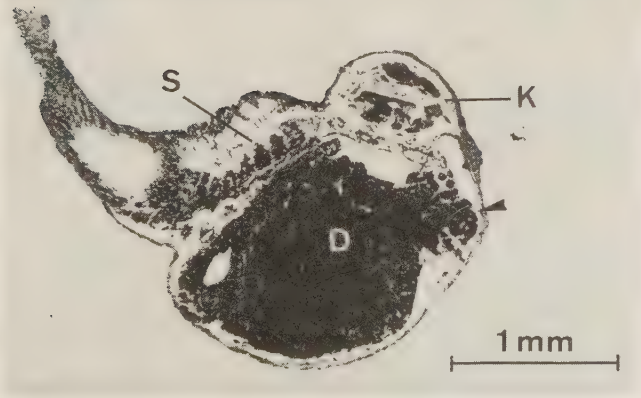
e) Behandlung 24 h mit 2 ppm. Dottersack extrudiert (A = Auge; Ak = Außenkieme; E = Extrusion; M = Magen; T = Telencephalon).



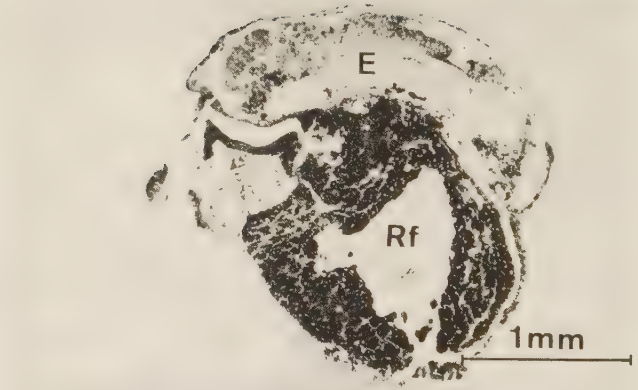
15a



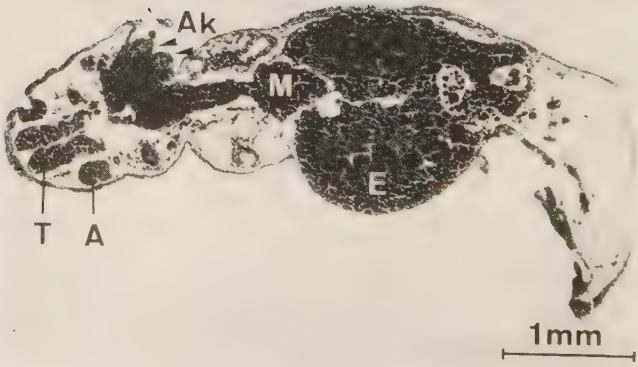
15b



15c



15d



15e

Schwanzknick auf (Abb. 15c).
Die bei 1-stündiger Behandlung aufgetretene Formenvielfalt der Mißbildungen war in diesem Fall nicht zu finden. Alle verkrüppelten Embryonen starben wie bei kurzer Behandlung im Laufe der weiteren Entwicklung ab. Spätestens 20 Tage nach dem jeweiligen Schlüpftag waren alle Tiere tot.

2. Behandlungsstadium Gastrula und frühe Neurula (Versuchsgruppe 3, 4)

1-stündige Behandlung: Wurden Embryonen während der Gastrulation mit Aretit® behandelt, so kam es bei Konzentrationen ≥ 40 ppm zu Entwicklungsstörungen. Während bei 40 ppm nur 6 % der Embryonen verkrüppelt waren, stieg die Zahl bei 60 ppm auf 64 % und bei 80 ppm auf 100 %. Bei der letztgenannten Konzentration konnten sich die Versuchstiere nicht mehr aus der Eihülle befreien. Sie degenerierten in einem Zeitraum von 2 - 3 Tagen.
Die Mißbildungen waren vermutlich das Ergebnis einer gestörten Osmoregulation. Der ventrale Kopf- und Rumpfbereich war in der Regel durch Flüssigkeitsansammlungen so aufgebläht, daß der Embryo wie auf einer Kugel lag (Abb. 16a). Die histologische Untersuchung zeigte flüssigkeitsgefüllte Räume im Bereich des Dottersackes oder zwischen dem Dottersack und dem epidermalen Ektoderm. Im letzteren Falle wurden die Dotterzellen nach dorsal gepreßt (Abb. 17a, b). Ähnliche Ödeme zwischen Dottersack und dorsalem Entoderm führten zur Verlagerung der Dotterzellen an die ventrale Peripherie. In jedem Fall war das Integument stark gedehnt. Bei einigen Embryonen (weniger als 20 % aller mißgebildeten Tiere) unterblieb auch die Ausbildung des Neuralrohres und/oder des Notochordes.

Abb. 16: Krüppelformen nach Behandlung während der Gastrulation.

a) Behandlung 1 h mit 60 ppm. Ödem im Bauchraum und vollkommen desorganisierte Körperform.

b) Behandlung 24 h mit 0,7 ppm. Typische Krüppelform.

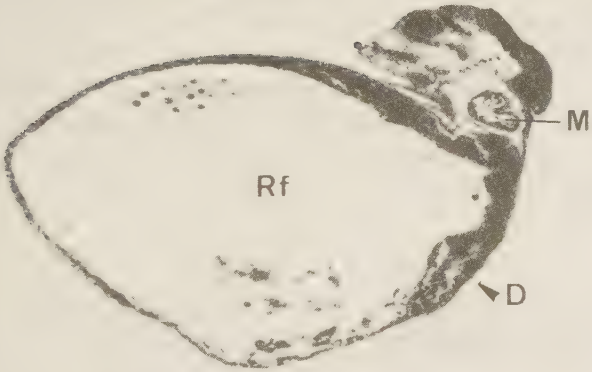
Abb. 17: Schnitte durch Embryonen, die im Gastrulastadium behandelt wurden.

a) Behandlung 1 h mit 60 ppm (Querschnitt). Vollkommene Desorganisation des Organismus. Ein großer flüssigkeitsgefüllter Raum preßt den Dottersack nach dorsal (D = Dotterzellen; Rf = flüssigkeitsgefüllter Raum).

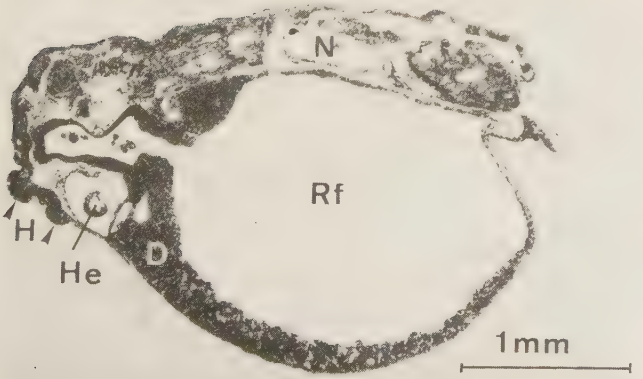
b) Behandlung 1 h mit 80 ppm (Querschnitt). Großer flüssigkeitsgefüllter Raum (Rf). Anlagen des Neuralrohres und des Notochordes nicht vorhanden (D = Dotterzellen; M = Magen).

c) Behandlung 24 h mit 1 ppm (Längsschnitt). Zwischen Dottersackzellen und dorsalem Entoderm riesiger flüssigkeitsgefüllter Raum. Dotterzellen werden dadurch nach ventral gepreßt (D = Dotterzellen; H = Haftdrüsen; He = Herz; N = Notochord; Rf = flüssigkeitsgefüllter Raum).

17a



17b



17c

Bei Behandlung der Embryonen im frühen Neurulastadium waren die Ergebnisse ähnlich. In den meisten Fällen kam es jedoch nur zur Bildung von Ödemen. Nur noch ein kleiner Teil der mit 80 ppm behandelten Embryonen konnte die Eihülle als Krüppel verlassen.

24-stündige Behandlung: Die längerfristige Einwirkung von Aretit® während der späten Gastrulation führte zu ähnlichen Mißbildungen wie die Kurzzeitbehandlung. Bei 0,3 ppm zeigten 5 %, bei 0,5 ppm 11 %, bei 0,7 ppm 17 % und bei 1 ppm 100 % der Tiere Ödeme im Kopf- bzw. Rumpfbereich (Abb. 16b).
Die Behandlung während der Neurulation verursachte bei allen Konzentrationen > 1,5 ppm starke Ödembildungen. Die Embryonen konnten die Eihülle nicht mehr verlassen (Abb. 17a). Vereinzelt traten wieder Embryonen ohne Neuralrohr und/oder Notochord auf. Alle während der Gastrualtion oder Neurulation geschädigten Entwicklungsstadien überlebten höchstens 20 Tage nach dem jeweiligen Schlüpfen.

3. Behandlungsstadium 24 h nach dem Schlüpfen (Versuchsgruppe 9)

1- und 24-stündige Behandlungsdauer: Unter allen, nach dem 1. Schlüpftag geprüften Stadien, zeigte nur noch die Versuchsgruppe 9 nach 1- bzw. 24-stündiger Behandlung äußerlich erkennbare Schädigungen.
Nach 1-stündiger Behandlung waren bei 30 ppm 40 % der Versuchstiere, bei 40 ppm 80 % von Mißbildungen betroffen. Die gleichen Krüppelformen zeigten sich nach 24-stündiger Vergiftung. Hier traten sie bereits bei Konzentrationen von 0,02 ppm auf (20 % der Versuchstiere). Bei 0,1 ppm wiesen alle Versuchstiere Schädigungen auf.

Nach 1-stündiger Intoxikation traten bereits 24 - 48 h danach unterschiedlich große Ödeme im Kiemen- und Rumpfbereich auf (Abb. 18b). In schweren Fällen waren Kopf und Rumpf zu einer großen, prall mit Flüssigkeit gefüllten Kugel, angeschwollen (Abb. 18c). 14 Tage nach Versuchsende waren alle geschädigten Individuen tot.

Nach 24-stündiger Behandlung trat häufig auch noch eine Abknickung des Schwanzes in vertikaler oder horizontaler Richtung auf. Derart mißgebildete Tiere konnten sich nur noch durch krampfartige Zuckungen fortbewegen. Während der Weiterentwicklung degenerierte der Schwanz vollständig. Die Tiere starben dann meist innerhalb weniger Tage (Abb. 18d, e, f).
Alle beschriebenen Mißbildungen traten somit nur nach Vergiftung im Blastula-, Gastrula- und Neurulastadium auf, sowie bei Embryonen, die 24 h nach dem Schlüpfen behandelt wurden. Für alle anderen untersuchten Enticklungsstadien war der Kontakt mit dem Herbizid in entsprechender Konzentration ohne vorausgehende Mißbildungen tödlich.

Abb. 18: Embryonen, die 1 Tag nach dem Schlüpfen behandelt wurden. Alter der Individuen: 9 - 10 Tage.

a) Kontrolle.

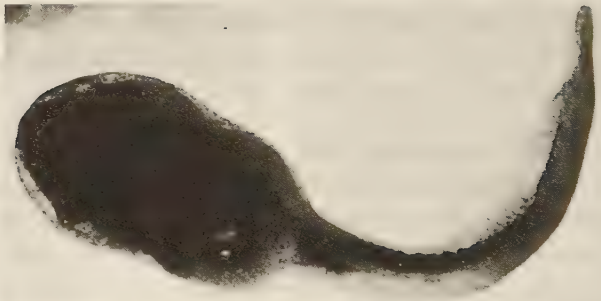
b) Behandlung 1 h mit 30 ppm. Ödeme in Kopf- und Rumpfbereich.

c) Behandlung 1 h mit 40 ppm. Der ganze Körper ist zu einer flüssigkeitsgefüllten Kugel angeschwollen.

d) Behandlung 24 h mit 0,08 ppm (Ventralseite des Embryos). Knickung des Schwanzes und Beginn der Schwanzdegeneration (→).

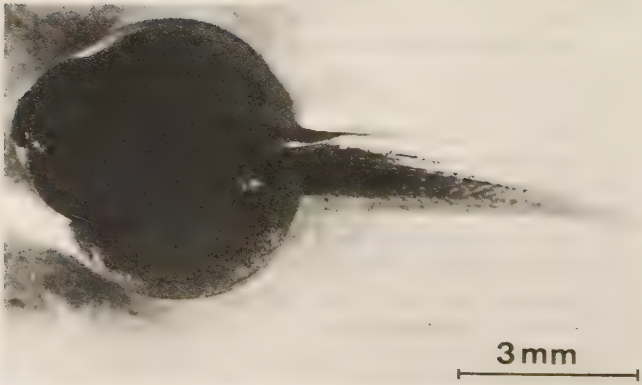
e) Behandlung 24 h mit 0,1 ppm. Vertikaler Schwanzknick und Erosion im Flossensaum.

f) Behandlung 24 h mit 0,1 ppm. Scharfer vertikaler Schwanzknick.

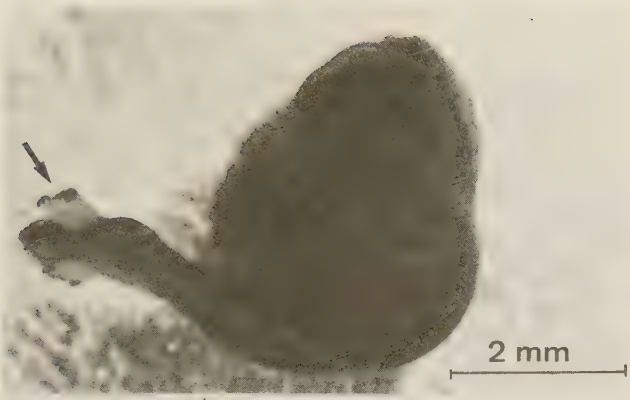


18a

18b

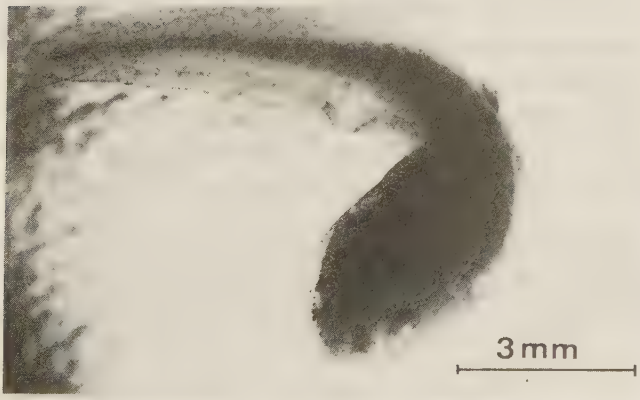


18c



18d

18e



18f

D. Störungen im Wachstum und in der Metamorphose

1. Einfluß auf Längen- und Gewichtszunahme

Als Ausgangsstadium diente ein Embryonalstadium (Stufe 14, Alter 4 Tage) und ein Larvalstadium (III - IV, Alter 28 Tage). Alle verwendeten Konzentrationen wurden in Tabellen 6 und 7 vermerkt. In jeder Konzentrationsstufe wurden 10 bzw. 20 Individuen geprüft. Die Versuche erfolgten bei 10,0 ± 0,2 °C Wassertemperatur in Vollglasbecken (30x 22x22,5 cm) mit jeweils 10 l Tübinger Leitungswasser. Die Substanz wurde zu Beginn der Versuche in die Becken einpipettiert. Während der Versuche erfolgte kein Wasserwechsel. Zu Beginn und am Ende des Versuchs (12. Tag) wurden Gewicht und Körperlänge ermittelt. Vor der Wägung (Sartorius Analysenwaage; Meßgenauigkeit 0,1 mg) wurden die Tiere auf Zellstoff gelegt um überschüssiges Wasser zu entfernen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem Signifikanztest nach Student. Zuerst wurde die nichtsignifikante Unterschiedlichkeit der Ausgangsstadien sichergestellt (Varianzanalyse), dann die Mittelwertsunterschiede (Länge, Gewicht) zwischen Kontroll- und jeweiliger Behandlungsgruppe nach Versuchsende geprüft. Bei zu großen Varianzunterschieden (F-Test) wurde der von Welch modifizierte t-Test herangezogen (Mittenecker 1952).

Embryonalstadium (Stufe 14): Nach 12 Tagen waren die Kontrollen in diesem Versuch um durchschnittlich 5,6 mm gewachsen, ihr Gewicht hatte um 16,5 mg zugenommen. Die 12-tägige Einwirkung von 0,06 ppm Aretit® zeigte auf Längen- und Gewichtszunahme noch keinen Einfluß; signifikant wurde der Unterschied aber bei der Gewichtszunahme nach Behandlung mit 0,07 ppm (Tab. 6; t = 5,01). Hier betrug die durchschnittliche Gewichtszunahme nur noch 9,1 mg. Keine Signifikanz ergab der Unterschied bei der Gesamtlänge, obwohl der Längenzuwachs im Mittel nur 3,6 mm betrug. Ursache hierfür ist wohl die hohe Streuung (S.D. = 3,0 mm; Tab. 6). Bei einer nur geringfügig erhöhten Konzentration von 0,075 ppm starben alle Individuen innerhalb des Versuchszeitraumes ab; eine Auswertung war nicht mehr möglich.

Larvalstadium (Stadium III - IV): Die verwendeten Larven wurden während des ganzen Versuches mit Salat und TetraMin bzw. TetraPhyll Großflocken (Tetra Werke, D-4520 Melle) ad

Tab. 6: Gesamtlänge und -gewicht bei Embryonen (Stufe 14) vor und nach 12-tägiger Einwirkung verschiedener Konzentrationen. n = Zahl verwendeter Individuen pro Konzentration; min. = Minimalwert; max = Maximalwert; S.D. = Standardabweichung.

		Versuchsbeginn Gewicht (mg)	Länge (mm)	n	Versuchsende Gewicht (mg)	Länge (mm)	n
Kontrolle	$\bar{x}$	13,5	9,0 [1]	20	30,0	14,7	18 [2]
	S.D.	1,7			4,6	0,5	
	min.	10,0			23,0	13,0	
	max.	16,0			40,0	15,0	
0,06 ppm	$\bar{x}$	13,2	9,0	20	28,0	14,1	14
	S.D.	2,0			4,2	0,6	
	min.	11,0			17,0	13,0	
	max.	19,0			34,0	15,0	
0,07 ppm	$\bar{x}$	12,9	9,0	20	22,0 *	12,6	16
	S.D.	1,8			4,7	3,0	
	min.	10,0			16,0	11,0	
	max.	17,0			28,0	14,0	

* Signifikanz bei $P < 0,05$
[1] Für diesen Versuch wurden nur Embryonen von 9 mm Gesamtlänge ausgewählt
[2] Zahl überlebender Individuen

lib. gefüttert. Bei den Kontrollen stieg das Gewicht innerhalb der 12 Tage um 62,8 mg, was einem Zuwachs von 100 % entspricht (Tab. 7). Die durchschnittliche Längenzunahme betrug 1,7 mm. Bei Behandlung mit 0,2 und 0,3 ppm lag die Gewichtssteigerung bei 60 bzw. 37 mg. Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant von den Werten der Kontrollen. Dagegen war bei der Behandlung der Larven mit 0,4, 0,5 und 0,6 ppm die Gewichtszunahme in jedem Fall signifikant verringert. Im Vergleich zu den Kontrollen betrug sie bei 0,5 ppm noch 38 %, bei 0,6 ppm nur noch 8,6 % (Tab. 7). In letzterem Falle stagnierte die Entwicklung nahezu ganz. Das Längenwachstum zeigte in keinem Fall signifikante Unterschiede zu dem Mittelwert der Kontrollen.

Tab. 7: Gesamtlänge und -gewicht bei Larven (Stadium III - IV) vor und nach 12-tägiger Einwirkung verschiedener Konzentrationen. n = Zahl verwendeter Individuen pro Konzentration; min. = Minimalwert; max = Maximalwert; S.D. = Standardabweichung.

		Versuchsbeginn			Versuchsende		
		Gewicht (mg)	Länge (mm)	n	Gewicht (mg)	Länge (mm)	n
Kontrolle	$\bar{x}$	63,0	19,7	10	125,8	21,3	10 [1)]
	S.D.	16,0	1,2		21,0	1,0	
	min.	50,0	19,0		75,0	20,0	
	max.	83,0	21,5		145,0	23,0	
0,2 ppm	$\bar{x}$	67,3	20,3	10	126,8	21,3	9
	S.D.	18,1	1,4		25,3	1,0	
	min.	52,0	19,0		84,0	20,0	
	max.	94,0	22,0		139,0	23,5	
0,3 ppm	$\bar{x}$	69,4	19,2	10	106,9	21,3	9
	S.D.	18,3	3,9		30,6	1,2	
	min.	44,0	18,5		64,0	20,0	
	max.	94,0	21,5		111,0	22,0	
0,4 ppm	$\bar{x}$	67,0	20,3	10	93,0*	21,3	7
	S.D.	17,1	1,6		16,7	1,1	
	min.	36,0	17,5		68,0	19,0	
	max.	84,0	22,4		109,0	22,5	
0,5 ppm	$\bar{x}$	67,6	20,1	10	91,4*	21,1	6
	S.D.	17,1	1,0		13,9	1,1	
	min.	46,0	18,5		47,0	18,5	
	max.	92,0	22,5		100,0	22,5	
0,6 ppm	$\bar{x}$	69,5	20,0	10	75,7*	20,3	4
	S.D.	17,7	1,3		21,0	1,8	
	min.	49,0	18,0		56,0	18,0	
	max.	107,0	22,5		109,0	22,5	

* Signifikanz bei $P < 0,05$
1) Zahl überlebender Individuen

2. Einfluß auf die Metamorphose

Als Versuchstiere dienten Kaulquappen, die bereits 7 - 8 mm lange Hinterextremitäten besaßen. Um ein einheitliches Ausgangsstadium zu erhalten wurde darauf geachtet, daß bei allen Individuen die Analröhre vollständig verschwunden war (dies ist äußerlich gut sichtbar und charakterisiert Stadium XVIII). Da die Metamorphose bei der bisher angewandten Wassertemperatur von 10 °C nicht stattfindet, wurde der Versuch bei 20 + 2 °C durchgeführt. Als Versuchsgefäße dienten Vollglasbecken (30x22x22,5 cm), die mit 10 l Tübinger Leitungswasser gefüllt waren. In jedem Konzentrationsbereich (0,05 - 0,30 ppm) wurden 10 Versuchstiere getestet. Alle 2 Tage wurde die Aretit®-Emulsion in der entsprechenden Konzentration erneuert. Für die Kaulquappen bedeutete dies eine bis zu 15 Tage anhaltende Einwirkung des Herbizides. Als Parameter für die erfolgreiche Metamorphose diente der Zeitpunkt, zu dem eine oder beide Vorderextremitäten sichtbar waren. Die Registrierung erfolgte jeweils im Abstand von 48 h. In Abb. 19 sind die Versuchsergebnisse graphisch dargestellt.

7 Tage nach Versuchsbeginn erreichte das erste Kontrolltier das festgelegte Metamorphosestadium. Dieser Tag wurde fortan als Metamorphosetag 1 bezeichnet. Innerhalb der folgenden 10 Tage erreichten die weiteren 9 Kontrollen diesen Zustand.
Auch bei Behandlung mit 0,05 ppm wurde 7 Tage nach Versuchsbeginn das erste Individuum mit zwei Vorderextremitäten registriert. An den nachfolgenden Tagen war hier der Unterschied zu den Kontrolltieren gering. Bei allen höheren Konzentrationen verzögerte sich die Entwicklung, insbesondere bei 0,2 und 0,3 ppm. In diesem Bereich hatte auch am 5. Metamorphosetag noch kein Tier das festgelegte Stadium erreicht (Abb. 19). Zudem starben bei 0,3 ppm 2 Tiere vorzeitig. Am 9. Metamorphosetag hatten alle 10 mit 0,05 ppm behandelten Tiere das Entwicklungsstadium XX erreicht. Von den mit 0,2 ppm behandelten Tieren besaßen dagegen erst 2 ihre Vorderbeine. Auch hier starben 3 Kaulquappen bereits vorzeitig. Bei 0,3 ppm erhöhten sich die Verluste zu diesem Zeitpunkt schon auf 5 Tiere. Von den übrigen hatte noch kein Individuum Vorderbeine entwickelt. Erst am 11. Tag war bei einem Tier ein Vorderbein erkennbar; bereits

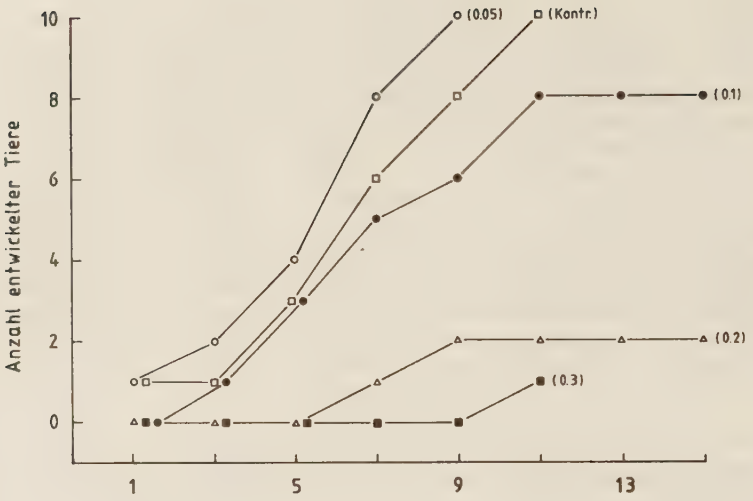


Abb. 19: Anzahl von Kaulquappen mit entwickelten Vorderbeinen nach chronischer Einwirkung von verschiedenen Konzentrationen. Auf der Abszisse sind die Metamorphosetage, auf der Ordinate die jeweilige Anzahl entwickelter Individuen aufgetragen. ( ) = verwendete Konzentration in ppm.

24 h später war es jedoch tot.

Bei Versuchsende, nach 15 Metamorphosetagen, waren bei 0,3 ppm 8 Versuchstiere gestorben, 2 noch im Ausgangsstadium. Bei 0,2 ppm hatten 2 Tiere Vorderbeine, 4 waren noch im Ausgangsstadium und 4 weitere waren tot. Bei 0,1 ppm hatten sich 8 Kaulquappen bis zum Stadium XX entwickelt. Die Individuen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe 0,05 ppm hatten schon seit 6 bzw. 4 Tagen das gewünschte Stadium erreicht (Abb. 19).

V. Diskussion

Ein Vergleich der Toxizität von 18 verschiedenen Pestiziden (Sanders 1970) ergab, daß die Gruppe der Herbizide (8) - von einer Ausnahme abgesehen - nur eine relativ geringe direkte Giftwirkung besitzt. Nach Cooke (1977) haben einige aquatische Herbizide (Diquat, Dichlobenil) überhaupt keine Auswirkungen auf die Larven von Fröschen und Kröten. Als Ausnahme erwies sich die Substanz Trifluoralin (Sanders 1970), ein Dinitrophenol. Sie gehört der gleichen Gruppe wie Aretit® an und zeigt eine ähnliche Toxizität.

Die an 24 verschiedenen Entwicklungsstadien von Rana temporaria ermittelte Empfindlichkeit gegenüber Aretit® ergab sowohl bei 1-stündiger als auch bei 24-stündiger Einwirkungszeit große Unterschiede im Verlaufe der Entwicklung. Bei 1-stündiger Behandlung stieg die Toleranz vom Zweizellstadium bis zur Neurulation zunächst stark an (LC_{50}-Wert 80 ppm, Abb. 20). Anschließend reagierten die Tiere aber wieder empfindlicher und zeigten eine maximale Sensibilität bei Freßbeginn (Versuchsgruppe 15). Von geringen Veränderungen abgesehen, blieb diese Empfindlichkeit bis zur Metamorphose erhalten (Abb. 20).
Die relativ hohe Empfindlichkeit der jüngsten Entwicklungsstadien bei einer 1-stündigen Aretit®-Behandlung läßt sich auf das Vorhandensein der Gallerthülle zurückführen. Diese quillt innerhalb von 24 h nach der Eiablage stark auf (Cooke 1972). An einer typischen Verfärbung läßt sich das Eindringen und die Adsorption des Giftstoffes verfolgen. Bei einer kurzfristigen Vergiftung wird dadurch das Gift in der Gallerte gespeichert und über Stunden hinweg abgegeben. Die effektive Vergiftungsdauer kann sich dadurch verlängern.
Die bei kurzfristiger Aretit®-Intoxikation festgestellte

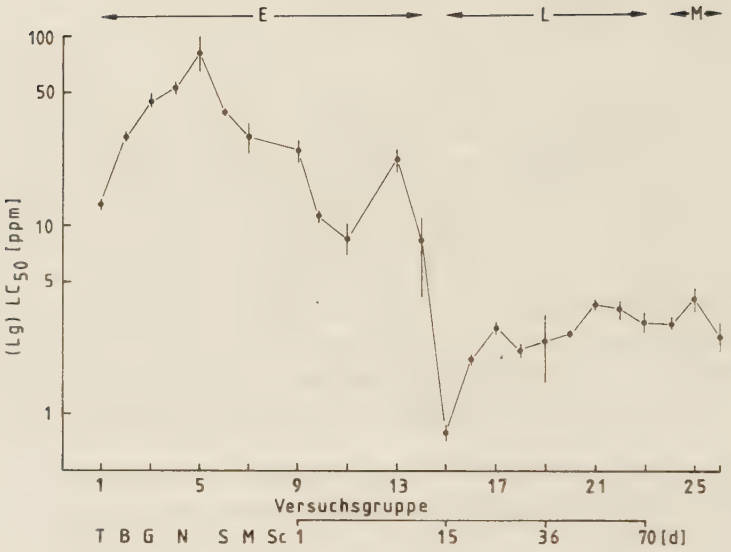


Abb. 20: LC_{50}-Werte und 95 % Vertrauensgrenzen bei verschiedenaltrigen Entwicklungsstadien von Rana temporaria. Auf der Abszisse sind die Versuchsgruppen (1-26), darunter der entsprechende Entwicklungsstand aufgetragen (T = 1. Teilungsstadium; B = Blastula; G = Gastrula; N = Neurula; S = Schwanzknospenstadium; M = Stadium beginnender Muskularaktivität; Sc = schlüpfendes Stadium; nach dem Schlüpfen erfolgt die Altersangabe in Tagen). Auf der Ordinate ist der 1 h LC_{50} mit Angabe der 95 % Vertrauensgrenzen aufgetragen (E = Embryonalstadien; L = Larvalstadien; M = metamorphe Stadien). Behandlungsdauer 1 h.

hohe Empfindlichkeit der frühen Teilungsstadien mit nachfolgender Abschwächung bis zur Neurulation konnte auch bei Embryonen der Gattung Xenopus (Ishida et al. 1955) nachgewiesen werden. Die Störung der frühen Embryonalentwicklung durch "entkoppelnd" wirkende Substanzen scheint jedoch auch bei Fischen ähnlich zu verlaufen. So berichtet Ishida (1951) bei Behandlung von Entwicklungsstadien von Oryzias

latipes mit 2,4-Dinitrophenol von einer abnehmenden Empfindlichkeit zwischen befruchtetem Eistadium und Stadium optischer Vesikel. Das gleiche Pestizid bewirkte auch beim Hering (Clupea harengus) eine erhöhte Empfindlichkeit ontogenetisch "junger" Embryonalstadien gegenüber "älteren" (Rosenthal und Stelzer 1970). Von allen getesteten Embryonalstadien der Regenbogenforelle zeigten die Neurulastadien gegenüber dem Larvizid TFM (3-Trifluormethyl-4-Nitrophenol) die höchste Toleranz.

Die Erklärung dieser Unterschiede ist schwierig. Sicherlich greift Aretit® auch bei Amphibien in den Energiestoffwechsel und in die ATP-Synthese ein. Während der Ontogenese nimmt jedoch schon sehr früh der O_2-Verbrauch bis zum Zeitpunkt der äußeren Ernährung zu (Witschi 1956, Parnas und Krasinska 1921). Eine steigende Empfindlichkeit wäre also mit zunehmendem Alter der Embryonen zu erwarten. Ishida et al. (1959) fand jedoch, daß zumindest bei Fischembryonen einem erhöhten O_2-Bedarf kein erhöhter ATP-Spiegel entsprechen muß. Bei den Oryzias Embryonen blieb der ATP-Gehalt des Gesamtorganismus in den frühen Entwicklungsstadien unverändert; der erhöhte Stoffwechsel wird möglicherweise durch einen beschleunigten "turn over" bewirkt (Stelzer et al. 1971).

Die unterschiedliche Empfindlichkeit der frühen Embryonalstadien könnte somit eher durch eine veränderte Permeabilität der embryonalen Hülle (Gallert- und Eihülle) erklärt werden. Unter Einwirkung von Aretit® läßt die osmotische Resistenz nach oder bricht zusammen. Möglicherweise wird diese Barriere nach der Unterbindung der ATP-Synthese in den Oberflächenepithelien aufgehoben. Die Schutzwirkung dieser Ei- und Gallerthülle könnte sich bis zu einem gewissen Alter steigern, zum Schlüpfen hin jedoch wieder abnehmen. Die von Greenhouse (1976a) an Amphibien der Gattung Xenopus laevis durchgeführte Untersuchung brachte als Ergebnis ebenfalls eine hohe Widerstandsfähigkeit der frühen Embryonalstadien gegenüber den Wirkstoffen Methylhydra-

zin und Dimethylhydrazin (Amine). Auch hier (Greenhouse 1976, 1976a) wird als Ursache eine hohe Impermeabilität der Embryonen in der Gallerthülle angegeben.
Kurz vor dem Schlüpfen wird die Empfindlichkeit schon deutlich geringer. Sie steigert sich nachfolgend bis zur Umstellung der Embryonen auf äußere Ernährung (Versuchsgruppe 15) sowohl bei 1-stündiger als auch bei 24-stündiger Behandlung (Abb. 20, Abb. 21). Nach den Untersuchungen von Witschi (1956) und Wills (1936) ist dies für die Froschembryonen der Augenblick des höchsten O_2-Bedarfs (pro Gewichtseinheit). Ishida et al. (1959) stellte zum gleichen Zeitpunkt bei Fischembryonen eine stark gesteigerte ATPase-Tätigkeit fest. Es ist möglich, daß hier eine direkte Wirkung von Aretit® auf die ATP-Synthese vorliegt, und diese Störung im Energiestoffwechsel zu einer gefährlichen Intoxikation führt. Die Untersuchungen von Paflitschek (1977, 1979) an Tilapien-Gelegen (Sarotherodon leucostictus) ergaben ebenfalls diesen Empfindlichkeitsanstieg im Verlauf von 14 Tagen nach der Befruchtung. In diesem Fall erfolgte die Intoxikation mit Lebaycid (Organophosphat) und Bayluscid (5,2'-Dichlor-4'-nitrosalicylanilid).
Die Übergangsphase zwischen der Aufzehrung der letzten Dotterreserven und der ersten Nahrungsaufnahme erweist sich somit als höchst empfindlich gegenüber verschiedenen toxischen Substanzen. Dies gilt gleichermaßen für die Entwicklung von Amphibien und Fischen (Hall 1983).
Diese Ansicht läßt sich noch dadurch bekräftigen, daß die Empfindlichkeit der verschiedenen Rana-Stadien bei 1- und bei 24-stündiger Behandlung im wesentlichen ähnlich ist (Abb. 20, 21). Bei kurzzeitiger und bei langfristiger Einwirkung liegt die größte Toleranz jeweils in den Versuchsgruppen 5 und 6 (Neurulastadium bzw. Schwanzknospenstadium), die größte Empfindlichkeit innerhalb der ersten 15 Tage nach dem Schlüpfen. Die Embryonen sind demnach stets weniger empfindlich als die Larven. Dies geht besonders anschaulich aus den Versuchen mit 1-stündiger Behandlung her-

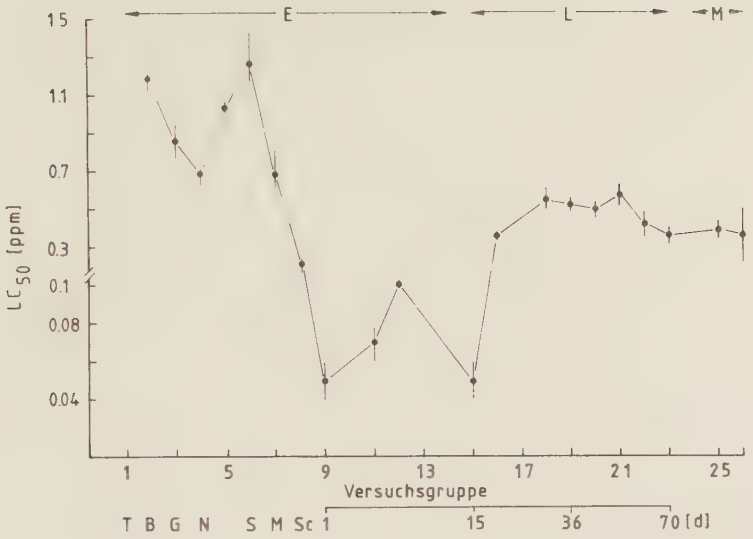


Abb. 21: LC_{50}-Werte und 95 % Vertrauensgrenzen bei verschiedenaltrigen Entwicklungsstadien von Rana temporaria. Behandlungsdauer 24 h. Erklärungen wie in Abb. 20.

vor.

Eine Abnahme der Empfindlichkeit stellt sich erneut etwa 8 Tage nach der Umstellung auf äußere Ernährung ein. Nach Witschi (1956) sinkt in diesem Zeitraum der O_2-Bedarf der Larven deutlich ab.

Aretit® beeinflußt auch den zeitlichen Ablauf der Differenzierung. Die Behandlung von Blastula- und Neurulastadien (1 oder 24 h) führte in Abhängigkeit von der Konzentration zur zeitlichen Verzögerung der Entwicklung bis zu 5 Tagen. Schon äußerlich war ein Entwicklungsstillstand bis zu 4 Tagen erkennbar. Erst danach erfolgte eine Weiterentwicklung oder die Embryonen starben ab. Rosenthal und Stelzer

(1970) stellten eine ähnliche Blockade der morphogenetischen Prozesse bei Heringsembryonen fest, die zuvor mit 2,4-Dinitrophenol behandelt wurden. In diesen Fällen endete die Intoxikation jedoch stets tödlich.
Neben der Verschiebung des Schlüpfbeginnes verlängerte sich unter dem Einfluß von Aretit® auch die Dauer der Schlüpfperiode, im Extremfall bis zu 9 Tagen (Kontrollen 5 - 6 Tage). Das gleiche Phänomen fanden wiederum Rosenthal und Stelzer (1970) an den Fischembryonen, die zuvor 2,4-Dinitrophenol ausgesetzt wurden. Eine Retardierung in der Entwicklung stellte Dawson (1938) bei Behandlung von Embryonalstadien der Amphibienart Rana pipiens mit dieser Giftsubstanz fest. Auch hier können sich somit Störungen im Energiestoffwechsel manifestieren. Erst wenn die Energieversorgung unter den zur Aufrechterhaltung minimaler Lebensvorgänge notwendigen Wert absinkt, sterben die Embryonen ab.
Die Behandlung bereits fortgeschrittener Embryonen von Rana (nach dem Schwanzknospenstadium) mit Aretit® führt dagegen zu vorzeitigem Schlüpfen. Als Ursache für diese Beschleunigung läßt sich eine O_2-Verknappung im Gewebe anführen, die sich vermutlich nach der Vergiftung einstellt. Bei Erreichen eines kritischen O_2-Wertes (Grenzspannung) beginnt über einen neuro-humoralen Reflexmechanismus auch unter nicht-toxischen Bedingungen die Sekretion der Schlüpfenzyme (Buznikow 1957, Hamdorf 1961). Das verfrühte Schlüpfen kann jedoch nur bei Embryonen ausgelöst werden, die eine "druckspezifische" Schlüpfgröße besitzen (Hamdorf 1961). "Junge" Embryonen sind dagegen dazu nicht in der Lage.

Aretit® beeinflußt schließlich das Wachstum und die Metamorphose. Bereits bei den Embryonalstadien (Stufe 14) zeigt sich nach der Behandlung eine gegenüber den Kontrollen verminderte Gewichtszunahme und ein geringeres Längenwachstum. Bei den Larven (III/IV) betrug die Gewichtszu-

nahme nach Behandlung mit 0,4 und 0,6 ppm im Vergleich zu den Kontrollen nur noch 38 bzw. 8,6 %, was bereits einem Wachstumsstillstand nahekommt. Auch die Geschwindigkeit der Metamorphose verringert sich konzentrationsabhängig. Bei entsprechend hoher Herbizidkonzentration kommt es auch in diesem Entwicklungsstadium zur Blockade der morphogenetischen Prozesse. Ähnliche Ergebnisse erzielte Dawson bereits 1938 bei der Behandlung von Rana pipiens Embryonen und Larven mit 2,4-Dinitrophenol. Derartige Wachstumsverzögerungen bei Amphibienlarven sind aber noch von einer ganzen Reihe von Pestiziden, die verschiedenen Substanzgruppen angehören, bekannt (Dutta und Mohanty-Hejmadi 1978, Hall und Swineford 1980, Mohanty-Hejmadi und Dutta 1981, Osborn und French 1981, Scorgie und Cooke 1979).

Die Versuche haben gezeigt, daß nach der Behandlung der frühen Embryonalstadien gravierende Mißbildungen entstehen. Die Einwirkung im Blastulastadium beeinflußt die künftige Bildung der Medullarplatte sowie die Abgliederung des Notochordes. Die Entwicklung führt schließlich zu microcephalischen und acephalischen Embryonen, zu Extrusionen des Dottersackes und zu Duplikaturen von Rumpf und Schwanz. Damit vergleichbar sind Mißbildungen bei Fischembryonen, die zuvor mit Ethanol behandelt wurden (Laale 1972). Auch hier erfolgte die Intoxikation im Blastulastadium. Interesse gebührt auch einer Entdeckung von Roux (1888), der Mißbildungen vom gleichen Ausmaß nach mechanischer Einwirkung auf die Embryonen erhielt und sie als Diastasis medullaris bezeichnete. Schließlich fand Hertwig (1892) Doppelschwänzigkeit als Folge von Überbefruchtung. Ähnliche Entwicklungsstörungen (Microcephalus, Spina bifida, Dottersackextrusionen) stellten sich bei Xenopus Larven nach Lithiumvergiftungen (Hall 1942) von frühen Gastrulastadien ein, ferner bei Behandlung mit Hydrazinen noch im Verlauf der Neurulation (Greenhouse 1977). Nach Quecksilberbehandlung von Blastula-, Gastrula- und Neurulastadien (Dial

1976) unterblieb bei Xenopus Embryonen der Verschluß des Neuralrohres.
Während in der vorliegenden Untersuchung die Behandlung von weiter fortgeschrittenen Stadien (ab dem Schwanzknospenstadium) keine wesentlichen Deformationen mehr verursachte, führten andere toxische Stoffe (Nabam, Maneb, Dichlone) bei Behandlung im Schwanzknospenstadium noch zu schweren Mißbildungen. Sie reichten von Wellenstrukturen des Notochordes (Bancroft und Prahlad 1973) bis zur fehlenden Streckung von Rumpf- und Schwanzregion (Anderson und Prahlad 1976). Im letzteren Falle wurde in besonders schweren Fällen kein Kopf mehr ausgebildet.
Die vergleichbaren Untersuchungen weisen vor allem auf eine frühe Schädigung der Anlage des Neuralrohres und des Notochordes hin. Nach Waddington (1958) ist das Neuralrohr sogar als bevorzugter Angriffsort für verschiedene Substanzen zu betrachten. Alle Verbiegungen, Knicke im Schwanzbereich und die ausbleibende Körperstreckung lassen sich auf Schädigungen im Notochordbereich zurückführen (Cooke 1972, 1973, 1981, Greenhouse 1976a, 1977, Mookerjee 1953, Osborn und French 1981). Es bleibt offen, ob Aretit® bereits bei der Determination oder erst unmittelbar bei den Differenzierungsvorgängen eingreift. Nach Cooke (1973) sind bei der Entwicklung von Embryonen des Krallenfrosches bereits Determinationsprozesse betroffen.

Eine ganz andere Art von Entwicklungsstörungen läßt sich auf den Zusammenbruch der Osmoregulation zurückführen. Davon besonders betroffen waren die behandelten Gastrulastadien. Schon im Verlaufe der anschließenden Neurulation gerieten die Embryonen in dem hypoosmotischen Medium in den Zustand starker "Verwässerung" und zeigten im gesamten Körperbereich starke Anschwellungen. Ihre Deformation war so stark, daß sie die Eihülle nicht mehr selbständig verlassen konnten und darin abstarben. Ähnliche - auch tödliche - "Wassereinbrüche" sind bei Kaulquappen nach Be-

handlung mit den Pestiziden Miedzian 50 und Gesagard 50 bekannt (Jordan et al. 1977). An Fischembryonen (Esox lucius) vergrößerte sich der Rumpf nach Dioxin-Einwirkung um das 3 - 4 fache (Helder 1980). Nachdem sowohl bei Embryonen (Holtfreter 1943) als auch jungen Larven (Mc Ewen 1957) der äußeren Oberfläche eine wichtige Bedeutung in der Osmoregulation zukommt, könnte hier eine durch den Giftstoff direkt hervorgerufene Schädigung vorliegen.
Bei den nach der Herbizidbehandlung entstehenden Mißbildungen steigt die Zahl der Krüppel nicht konsequent mit der verwendeten Konzentration an. Die akut toxische Wirkung ist hier oftmals so groß, daß die Embryonen oder Larven absterben, noch ehe sich Entwicklungsstörungen manifestieren können. Die gravierendsten Krüppelbildungen treten hier vor allem bei Entwicklungsstadien auf, bei denen die Neurulation noch nicht abgeschlossen ist (bis Gruppe 5).

Die toxische Wirkung von Aretit® auf die Entwicklungsstadien von Amphibien ist somit schon im Bereich von niedrigen Konzentrationen, wie sie auch bei Belastungen im Gewässer auftreten können, erwiesen. Auch wenn man die Ergebnisse der Laborversuche nur mit Vorbehalt in den Freilandbereich übertragen kann, so muß diese Tatsache zumindest beim Einsatz der Substanz in Gewässern, oder schon in Gewässernähe berücksichtigt werden. Das Auftreten von Mißbildungen bei frühen Embryonalstadien erfordert äußerste Vorsicht beim Umgang mit dem Herbizid.

VI. Zusammenfassung

Die Empfindlichkeit von verschiedenen Entwicklungsstadien des Grasfrosches (Rana temporaria) wurde gegenüber dem Herbizid Aretit® geprüft.

1. Von der Eiablage bis zur Metamorphose wurden 24 Stadien jeweils einer 1- oder 24-stündigen Behandlung unterzogen. Als Parameter der Intoxikation diente der Grenzkonzentrationsbereich, der letale Bereich und der 1 h LC_{50}- bzw. 24 h LC_{50}-Wert. Beide Versuchsserien ergaben einen von der Ontogenese geprägten Verlauf der Empfindlichkeit. Frühe Embryonalstadien (bis zur Neurulation) zeigten hohe bis sehr hohe Toleranz. Im Verlauf der weiteren Entwicklung stieg die Empfindlichkeit an. Sie erreichte ihr Maximum nach Aufzehrung des Dottersackes bzw. zum Zeitpunkt der ersten äußeren Nahrungsaufnahme. Nach einer nur noch geringen Steigerung der Toleranz blieb der LC_{50}-Wert bis zur Metamorphose annähernd konstant.

2. Aretit® beeinflußte auch den zeitlichen Ablauf der Differenzierungsvorgänge. Es verzögerte den Schlüpfbeginn bis zu 5 Tage und die Dauer der Schlüpfperiode bis zu 9 Tage. Die Dauer der Schlüpfperiode veränderte sich im Zusammenhang mit der verwendeten Konzentration. Eine Behandlung der Embryonen kurz vor dem Schlüpfen verfrühte den Schlüpfbeginn und verkürzte die Schlüpfperiode im Extremfall auf 1 Tag. Die schützende Wirkung der Gallerthülle gegenüber Aretit® ließ sich bei frühen Embryonalstadien nachweisen.

3. Die Aretit®-Behandlung verursachte nach 1- und 24-stündiger Behandlung Mißbildungen bei bestimmten Entwicklungsstadien. Besonders schwere Verkrüppelungen traten

auf, wenn die Behandlung im Blastulastadium erfolgte (Verkürzungen von Schwanz und Rumpf, Krümmungen der Wirbelsäule, Microcephalus, Acephalus, Duplikaturen in Rumpf- und Schwanzberreich, Extrusionen des Dottersackes und Ödeme). Vereinzelt kam es zur vollständigen Desorganisation der Körperstruktur. Die Intoxikation während der Gastrulation und der frühen Neurulation führte häufig zu einer Störung der Osmoregulation und nachfolgend zu Ödemen in der Kopf- und Rumpfregion.

4. Aretit® bewirkte bei 4- und 24-Tage alten Entwicklungsstadien nach 12-tägiger chronischer Vergiftung (0,06 - 0,6 ppm) eine gegenüber Kontrollen signifikant verminderte Gewichtszunahme. Auch die Geschwindigkeit der Metamorphose wurde konzentrationsabhängig verzögert.

VII. Literatur

Anderson, R.J. und Prahlad, K.V. (1976): The deleterious effects of funghicides and herbicides on Xenopus laevis embryos. Archs. Environm. Cont. Toxicol. 4, 312 - 323.

Bancroft, R. und Prahlad, K.V. (1973): Effect of ethylene-bis (dithiocarbamicacid) disodiumsalt (nabam) and ethylenebis (dithiocarbamato) manganese on Xenopus laevis development. Teratology 7, 143 - 150.

Beatty, P.W., Holscher, M.A., Neal, R.A. (1976): Toxicity of 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin in larval and adult forms of Rana catesbeiana. Bull. Env. Cont. Tox. 16, 578 - 581.

Buznikow, G.A. (1957): On the physiology of the hatching glands of embryo in teleostea. Z. obsc. Biol. 18, 350 - 359.

Chandler, J.H. (1975): Toxicity in the lampricide 3-Trifluoromethyl-4-nitrophenol (TFM) to selected aquatic invertebrates and frog larvae. United States Department of the interior fish and wildlife Service, 3 - 7.

Cooke, A.S. (1972): The effect of DDT, Dieldrin and 2,4 D on amphibian spawn and tadpoles. Environ. Pollut. A 3, 51 - 68.

Cooke, A.S. (1973): The effects of DDT, when used as a mosquito larvicide, on tadpoles of the frog Rana temporaria. Environ. Pollut. A 5, 259 - 273.

Cooke, A.S. (1977): Effects of field applications of the herbicides Diquat and Dichlobenil on amphibians. Environ. Pollut. A 12, 43 - 50.

Cooke, A.S. (1979): The influence of rearing density on the subsequent response to DDT dosing for tadpoles of the frog Rana temporaria. Bull. Env. Cont. Tox. 21, 837 - 841.

Cooke, A.S. (1981): Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. Environ. Pollut. A 25, 123 - 133.

Dawson, A.B. (1938): Effects of 2,4-Dinitrophenol on the early development of the frog Rana pipiens. J. exp. Zool. 78, 101 - 116.

Dial, N.A. (1976): Metylmercury: Teratogenic and lethal effects in frog embryos. Teratology 13, 327 - 334.

Dutta, S.K. und Mohanty-Hejmadi, P. (1978): Life history and pesticide susceptible embryonic stages of the Indian bull frog Rana tigrina Daudin. Indian J. of Exp. Biol. 16, 727 - 729.

Edmisten, G.E. und Bantle, J.A. (1982): Use of Xenopus laevis larvae in 96-hour, flow-through toxicity tests with naphtalene. Bull. Env. Cont. Tox. 29, 392 - 399.

Greenhouse, G.A. (1976): The evaluation of toxic effects of chemicals in fresh water by using frog embryos and larvae. Environ. Pollut. A 11, 303 - 315.

Greenhouse, G.A. (1976a): Evaluation of the teratogenic effects of Hydrazine, Methylhydrazine and Dimethylhydrazine on embryos of Xenopus laevis, the South African clawed-toad. Teratology 13, 167 - 178.

Greenhouse, G.A. (1977): Toxicity of N-phenyl- -naphtylamine and Hydrazine to Xenopus laevis embryos and larvae. Bull. Env. Cont. Tox. 18, 503 - 511.

Hall, R.F. (1983): Herbicides: Liberators or poisoners of humankind ? Veterinary and Human Toxicology 25, 92 - 95.

Hall, R.J. und Swineford, D. (1980): Toxic effects of Endrin and Toxaphene on the southern Leopard frog Rana sphenocephala. Environ. Pollut. A 23, 53 - 65.

Hall, T.S. (1942): The mode of action of lithium salts in amphibian development. J. exp. Zool. 89, 1 - 35.

Hamdorf, K. (1961): Die Beeinflussung der Embryonal- und Larvalentwicklung der Regenbogenforelle (Salmo irideus, Gibb.) durch die Umweltfaktoren O_2-Partialdruck und Temperatur. Zeitschr. f. vergl. Physiol. 44, 523 - 549.

Helder, T. (1980): Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) on early life stages of the pike (Esox lucius L.). Science of the total environment 14, 255 - 264.

Hertwig, O. (1892): Urmund und Spina bifida. Eine vergleichend morphologische, teratogene Studie an missgebildeten Froscheiern. Archiv f. mikrosk. Anat. 39, 353 - 502.

Holtfreter, J. (1943): Properties and functions of the surface coat in amphibian embryos. J. exp. Zool. 2, 251 - 323.

Ishida, J. (1951): Effects of 2,4-Dinitrophenol on oxygen consumption during early development of the teleost Oryzias latipes. Annot. Zool. Jpn. 24, 181 - 185.

Ishida, J., Uramoto, M., Maruyama, K. (1955): Effect of 2,4-Dintrophenol and Sodium azide upon the oxygen uptake of toad embryos. J. Fac. Sci. Tokyo Univ. IV, 399 - 409.

Ishida, J., Taguchi, S., Maruyama, K. (1959): ATP content and ATPase activity in developing embryos of the teleost Oryzias latipes. Annot. Zool. Jpn. 32, 1 - 5.

Johnson, C.R. (1976): Herbicide toxicities in some Australian anurans and the effect of subacute dosages on temperature tolerance. Zool. J. of Lim. Soc. 59, 79 - 83.

Jordan, M., Rzehak, K. Maryanska, A. (1977): The effect of two pesticides, Miedzian 50 and Gesagard 50, on the development of tadpoles of Rana temporaria. Bull. Env. Cont. Tox. 17, 349 - 354.

Judd, F.W. (1977): Toxicity of Manosodium Methanearsonate herbicide to Couch's spadefood toad, Scaphiopus couchi. Herpetologica 33, 44 - 46.

Kopsch, F. (1952): Die Entwicklung des braunen Grasfrosches Rana fusca Roesel. Stuttgart.

Laale, H.W. (1972): Ethanol induced notochord and spinal chord duplications in the embryo of the zebrafish, Brachydanio rerio. J. exp. Zool. 177, 51 - 64.

Marian, M.P., Arul, V., Pandian, T.J. (1983): Acute and chronic effects of carbaryl on survival, growth, and metamorphosis in the bullfrog (Rana tigrina). Archs. Environm. Cont. Toxicol. 12, 271 - 275.

McEwen, R.S. (1957): Vertebrate embryology; part II: The development of the frog. New York.

Mittenecker, E. (1952): Planung und statistische Auswertung von Experimenten. Wien.

Mohanty-Hejmadi, P. und Dutta, S.K. (1981): Effects of some pesticides on the development of the Indian bullfrog Rana tigrina. Environ. Pollut. A 24, 145 - 161.

Mookerjee, S. (1953): An experimental study of the development of the notochordal sheath. J. Embryol. exp. Morph. 1, 411 - 416.

Niblett, P.D. und McKeown, B.A. (1980): Effect of the lamlamprey larvicide TFM (3-Trifluoromethyl-4-Nitrophenol) on embryonic development of the rainbow trout (Salmo gairdneri, Richardson). Water Res. 14, 515 - 519.

Osborn, D. und French, M.C. (1981): The toxicity of the mothproofing chemical Eulan WA new to frog Rana temporaria tadpoles. Environ. Pollut. A 24, 117 - 123.

Paflitschek, R. (1977): Untersuchungen über die toxische Wirkung von Bayluscid und Lebaycid auf Ei-, Jugend- und Adultstadien der Buntbarsche Tilapia leucosticta (Trewavas 1933) und Herotilapia multispinosa (Günther 1898). Dissertation, Tübingen.

Paflitschek, R. (1979): Untersuchungen über die toxische Wirkung von Bayluscid und Lebaycid auf Ei-, Jugend- und Adultstadien der Buntbarsche Tilapia leucosticta (Trewavas 1933) und Herotilapia multispinosa (Günther 1898). Zeitschr. f. angew. Zool. 66, 143 - 172.

Parnas, J.K. und Krasinska, Z. (1921): Über den Stoffwechsel der Amphibienlarven. Biochemische Zeitschrift 116, 108 - 137.

Romeis, B. (1968): Mikroskopische Technik. München, Wien.

Rosenthal, H. und Stelzer, R. (1970): Wirkungen von 2,4- und 2,5-Dinitrophenol auf die Embryonalentwicklung des Herings Clupea harengus. Mar. Biol. 5, 325 - 336.

Roux, W. (1888): Über die künstliche Hervorbrinung halber Embryonen durch Zerstörung einer der beiden ersten Furchungskugeln etc. Virchows Archiv 114.

Sanders, H.O. (1970): Pesticide toxicities to tadpoles of the western chorus frog Pseudacris triseriata and fowler's toad Bufo woodhousii fowleri. Copeia 2, 246 - 251.

Scorgie, H.R.A. und Cooke, A.S. (1979): Effects of the triazine herbicide Cyanatrin on aquatic animals. Bull. Env. Cont. Tox. 22, 135 - 142.

Stelzer, R. und Rosenthal, H. (1971): Einfluß von 2,4-Dinitrophenol auf die Atmung und die Konzentration einiger Metabolite bei Embryonen des Herings Clupea harengus. Mar. Biol. 11, 369 - 378.

Taylor, A.C. und Kollros, J.J. (1946): Stages in the normal development of Rana pipiens larvae. Anat. Rec. 94, 7 - 23.

Waddington, C.H. (1958): A note on the effect of some cytotoxic substances on amphibian embryos. J. Embryol. exp. Morph. 6, 363 - 364.

Wills, J.A. (1936): The respiratory rate of developing amphibia with special reference to sex differentiation. J. exp. Zool. 73, 481 - 510.

Witschi, E. (1956): Development of Vertebrates. Philadelphia, London.

Lebenslauf

Name:	Thomas Bertram Keller
Geburtstag:	23. 5. 1956
Geburtsort:	Ochsenhausen
Eltern:	Dr. med Hans Keller Antonie Keller, geb. Pfinder
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Wohnort:	7402 Kirchentellinsfurt Im Gässle 25
Schulausbildung:	1963 - 1967 Volksschule Ochsenhausen 1967 - 1969 Progymnasium Ochsenhausen 1969 - 1975 Allgäu-Gymnasium Kempten Abitur am 20. Juni 1975
Studium:	Vom WS 1975/76 bis SS 1977 an der Ludwig-Maximilians-Universität München die Fächer Germanistik, Geschichte und Geographie. Vom WS 1977/78 bis WS 1981/82 Biologie und Geographie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Abschluß des Studiums durch die Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien am 12. Oktober 1981.
Promotion:	"Untersuchungen über die toxische Wirkung des Herbizides Aretit® (Dinosebacetat) auf Nicht-Ziel-Organismen im Süßwasserökosystem" vom WS 1981/82 bis zum SS 1984 im Institut für Biologie III, Lehrstuhl Zoophysiologie, Abt. Physiologische Ökologie, unter Anleitung von Prof. Dr. E. Kulzer.

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. D. Ammermann
Prof. Dr. F.W. Bentrup
Prof. Dr. H. Blume
Prof. Dr. V. Braun
Dr. D. Bunke
Dr. K. Drumm
Dr. H. Erkert
Prof. Dr. H.G. Gierloff-Emden
Prof. Dr. H. Grees
Prof. Dr. K.G. Grell
Prof. Dr. K.-P. Hadeler
Prof. Dr. C. Hannß
Prof. Dr. W. Harder
Prof. Dr. A. Karger
Prof. Dr. G. Kohlhepp
Prof. Dr. E. Kulzer
Prof. Dr. J. Loeschke
Dr. R. Lorenz
Dr. G. Mickoleit
Prof. Dr. F.P. Möhres
Prof. Dr. F. Oberwinkler
Prof. Dr. R. Prinzinger
Dr. W. Rähle
Prof. Dr. W. Rundel
Prof. Dr. K.H. Schröder
Prof. Dr. B. Schwemmle
Prof. Dr. H. Suhr
Prof. Dr. W. Weiskirchner
Prof. Dr. P. Wenk
Prof. Dr. F. Westphal
Prof. Dr. F. Wilhelm
Prof. Dr. H.G. Zimpel

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45